

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFETS DE MÉTAUX (Cd ET Pb) ET D'UNE SUBSTANCE ÉNERGÉTIQUE (HMX)
SUR LA REPRODUCTION ET SUR LES PROTÉINES DE TYPE
MÉTALLOTHIONÉINE CHEZ *EISENIA ANDREI*

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
MATTHIAS BLANCHARD

JANVIER 2010

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 -Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Pierre Yves Robidoux, pour m'avoir offert la possibilité de réaliser cette maîtrise. Merci à Bertin Trottier, mon co-directeur, qui m'a donné beaucoup de son temps bien qu'il soit nouvellement retraité. Merci à Philip Spear et à Monique Boily qui ont su me rappeler mes objectifs et me mettre dans le bon chemin au début du projet.

Je voudrais souligner la participation aux manipulations en laboratoire de Virginie Bérubé (agent technique) et Yann Berthelot (étudiant au doctorat). Merci à vous deux pour votre aide et vos techniques de travail.

Je tiens aussi à dire un gros merci à Manon Sarrazin, Sabine Dodard, Kathleen Savard et Sylvie Rocheleau pour leur support technique, mais surtout pour leurs bons conseils et leur soutien moral. Merci également à Aristocle Ndayibagira, Bernard Lachance, Yves Prairie et Geoffrey Sunahara pour leur expertise et pour avoir consacré un peu de leur temps afin de répondre à mes nombreuses questions. La participation de Louise Paquet a également été appréciée dans ce projet afin d'effectuer les analyses chimiques de HMX dans les sols et les tissus de vers.

Merci à Mélissa Banville pour ses corrections, ses relectures et ses encouragements. Merci à ma famille et à mes amis qui m'ont beaucoup encouragé lorsque j'en ai eu besoin.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES.....	xi
LISTE DES SYMBOLES.....	xvi
RÉSUMÉ.....	xvii
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
CHAPITRE I	
PROBLÉMATIQUE.....	6
1.1 L'organisme à l'étude : Le ver de terre <i>E. andrei</i>	6
1.1.1 Biologie du ver de terre.....	6
1.1.2 Distribution des vers de terre.....	11
1.1.3 Importance écologique.....	12
1.1.4 Utilisation du ver de terre comme bioindicateur.....	13
1.1.5 Choix de l'espèce : <i>Eisenia andrei</i>	14
1.2 Les métallothionéines.....	16
1.2.1 Historique.....	16
1.2.2 Caractéristiques et fonctions.....	16
1.2.3 Méthodes de mesures.....	29
1.2.4 Biomarqueurs et exposition aux métaux et aux matériaux énergétiques.....	34
1.3 Les agents toxiques à l'étude.....	40
1.3.1 La question environnementale des «UneXploded Ordnances».....	40
1.3.2 Un composé polynitro-organique : le HMX.....	42

1.3.3	Le cadmium.....	52
1.3.4	Le plomb.....	59
1.4	Les sols.....	67
1.4.1	Considérations générales.....	67
1.4.2	Biodisponibilité.....	67
1.4.3	Contamination mixte.....	68
1.5	Objectifs généraux et spécifiques de l'étude.....	70
1.6	Design expérimental de l'étude.....	71
1.6.1	Test de reproduction.....	71
1.6.2	Contrôle de la contamination.....	76
1.6.3	Quantification des MTLPs.....	78
1.6.4	Analyses statistiques.....	84

CHAPITRE II

TOXICANT IMPACT ON METALLOTHIONEIN-LIKE PROTEIN

ACCUMULATION IN *EISENIA ANDREI*:

EFFECTS OF CADMIUM EXPOSURE IN A SANDY SOIL..... 87

2.1	Abstract.....	88
2.2	Introduction.....	89
2.3	Material and methods.....	93
2.3.1	Chemicals and reagents.....	93
2.3.2	Earthworms.....	93
2.3.3	Soil characteristics.....	93
2.3.4	Soil amendment with Cadmium.....	94
2.3.5	Exposure, sample collection and preparation.....	94
2.3.6	MTLP derivatization and HPLC detection.....	95
2.3.7	Protein content.....	96
2.3.8	Total Metallothionein-like protein.....	96
2.3.9	Cadmium analysis.....	96
2.3.10	Quality control.....	97
2.3.11	Statistical analysis.....	97
2.4	Results.....	98

2.4.1	Cadmium content in earthworm tissues.....	98
2.4.2	Survival, growth and reproduction of earthworms exposed to Cd.....	98
2.4.3	MTLP concentrations in earthworms exposed to Cd.....	99
2.4.4	Correlation between reproduction endpoints, Cd tissue and MTLP concentrations.....	100
2.4.5	Principal components analysis.....	101
2.5	Discussion.....	102
2.6	Conclusion.....	106
2.7	Acknowledgements.....	106
2.8	References.....	107
2.9	Table Index.....	113
2.10	Figure Captions.....	116

CHAPITRE III

IMPACT OF LEAD AND HMX EXPOSURES IN A SANDY SOIL ON METALLOTHIONEIN-LIKE PROTEIN CONCENTRATIONS AND RELATIONSHIPS TO *EISENIA ANDREI* REPRODUCTION.....

		120
3.1	Abstract.....	121
3.2	Introduction.....	122
3.3	Material and methods.....	126
3.3.1	Chemicals and reagents.....	126
3.3.2	Earthworms.....	126
3.3.3	Soil characteristics.....	127
3.3.4	Soil amendment with Lead.....	127
3.3.5	Soil amendment with HMX.....	127
3.3.6	Exposure, sample collection and preparation.....	128
3.3.7	MTLP derivatization and HPLC detection.....	129
3.3.8	Protein content.....	129
3.3.9	Lead analysis.....	130
3.3.10	HMX analysis.....	130
3.3.11	Quality control.....	130
3.3.12	Statistical analysis.....	131

3.4	Results.....	132
3.4.1	Toxicant content in soils and tissues.....	132
3.4.2	Lethality and growth.....	135
3.4.3	MTLP concentrations in Pb-exposed earthworms.....	133
3.4.4	MTLP concentrations in HMX-exposed earthworms.....	133
3.4.5	Correlations between reproduction parameters, MTLP and Pb concentrations.....	134
3.4.6	Correlations between reproduction parameters, MTLP and HMX concentrations.....	135
3.4.7	Principal components analysis.....	136
3.4.8	Others observations.....	136
3.5	Discussion.....	137
3.6	Conclusion.....	144
3.7	Acknowledgements.....	144
3.8	References.....	145
3.9	Figures Captions.....	152
3.10	Tables Index.....	152
	CONCLUSION GÉNÉRALE.....	160
	BIBLIOGRAPHIE.....	165

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1	Coupe transversale d'un ver de terre. Image tirée de Hickman <i>et al.</i> (1996) et traduite de l'anglais..... 8
1.2	Système reproducteur du ver de terre. A) coupe dorsale; B) coupe longitudinale. Image tirée de Wallwork (1983) et traduite de l'anglais..... 9
1.3	Accouplement et reproduction du ver de terre. Image tirée de Hickman <i>et al.</i> (1996) et traduite de l'anglais..... 11
1.4	Cycle de vie du ver <i>E. andrei/fetida</i> tiré de Venter et Reinecke, 1988 et traduit de l'anglais..... 15
1.5	Séquence des acides aminés des MTs animale (image tirée du site Internet du Commission de l'Énergie Atomique français (CEA), Direction des Sciences du vivant)..... 16
1.6	Les deux domaines α et β de la Cd_5Zn_2 -métallothionéine de Rat (<i>Rattus norvegicus</i>), tiré de Robbins <i>et al.</i> , 1991..... 16
1.7	Comparaison des séquences d'acides aminés de la MT d'invertébrés (<i>E. foetida</i>) et de la MT de vertébrés (<i>Rattus norvegicus</i>) d'après Gruber <i>et al.</i> , 2000 et Robbins <i>et al.</i> , 1991..... 22
1.8	Clivage post-translation donnant une MT autonome de <i>E. fetida</i> , constituée d'un seul domaine liant 4 Cd^{2+} , tiré de Gruber <i>et al.</i> , 2000..... 24
1.9	Mécanismes d'induction des MTs et des MTLPs, d'après Nielson <i>et al.</i> , 1985 et Roesijadi 1994a, 1994b..... 26

1.10	UXO de la base militaire de Wainwright, Alberta, Canada.....	40
1.11	Structure chimique du HMX.....	42
1.12	Ver <i>Eisenia andrei</i> adulte et mature (présence d'un clitellum bien développé).....	73
1.13	Schéma du design expérimental : déroulement du test de reproduction.....	74
1.14	Vers <i>Eisenia andrei</i> juvéniles.....	75
1.15	Cocons éclos/non éclos du ver <i>Eisenia andrei</i>	75
1.16	Montage permettant la collecte des juvéniles et des cocons.....	76
1.17	Étapes de la segmentation menant aux portions contenant les gonades et le clitellum du ver <i>E. andrei</i>	79
1.18	Schéma de la réaction de dérivation entre la MT et le fluorochrome SBD-F.....	81
2.1	Effect of tissue Cd concentrations on MTLP concentrations in <i>E.andrei</i> compartments (gonads, clitellum and non-reproductive tissue) after 28 days of exposure.....	117
2.2	Effects of tissue Cd concentrations on MTLP concentrations in <i>E.andrei</i> whole body after 28 days of exposure.....	118
2.3	Principal component analysis graph with Varimax rotation and Kaiser Normalisation for each variables.....	119
3.1	Effect of different Pb concentrations on MTLP concentration in <i>E.andrei</i> compartments after 28 days of exposure.....	153
3.2	Effect of different HMX concentrations on MTLP concentration in <i>E.andrei</i> compartments after 28 days of exposure.....	154
3.3	Principal Component analysis on data obtained after Pb exposure.....	155

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Ubiquité de la métallothionéine dans le règne animal (Vertébrés).....	21
1.1 (suite) Ubiquité de la métallothionéine dans le règne animal (Invertébrés).....	22
1.2 Effets de quelques composés organiques sur l'accumulation ou l'induction de MTLPs (tiré de Ndayibagira <i>et al.</i> , 2004).....	25
1.3 Recommandations préliminaires de la qualité des sols en fonction de la santé humaine et des fonctions écologiques pour les sites d'entraînement militaires (tiré de Robidoux <i>et al.</i> , 2006).....	43
1.4 "Ecological Soil Screening Levels" (Niveaux écologiques de dépistage du sol) préliminaires de l'USEPA pour les matériaux énergétiques (ME), en mg/kg sol (poids sec) (tiré de Robidoux <i>et al.</i> , 2006).....	43
1.5 Les Concentrations environnementales dans les Sols pour un Entraînement Militaire Durable (CSEMD), en mg/kg (poids sec) (tiré de Lachance <i>et al.</i> , 2008).....	44
1.6 Concentrations en HMX les plus importantes retrouvées dans les sols de RTA au Canada.....	46
1.7 Toxicité aiguë (léthalité) et chronique (nombre de cocons et de juvéniles) du HMX chez <i>Eisenia sp.</i> dans différents type sols.....	50
1.8 Concentrations en Cd retrouvées dans les sols de RTA au Canada.....	55
1.9 Toxicité aiguë (léthalité) et chronique (diminution du nombre de cocons) du Cd chez <i>Eisenia sp.</i> dans différents type de sols.....	57

1.10	Concentrations en Pb retrouvées dans les sols de RTA au Canada.....	62
1.11	Toxicité aiguë (léthalité) et chronique (diminution du nombre de cocons) du plomb chez <i>Eisenia sp.</i> dans différents types de sols.....	64
1.12	Caractéristiques physicochimiques des principaux sols utilisés lors d'études écotoxicologiques sur les vers de terre et autres invertébrés terrestres.....	69
2.1	Effects of Cd on adult weight changes (28 days) and on reproduction endpoints (56 days) in <i>E. andrei</i>	114
2.2	Reproduction endpoint responses and certain MTLPs levels correlate with tissue Cd concentration in <i>Eisenia andrei</i>	115
2.3	Correlations between the reproduction endpoint responses and MTLP concentrations in the three body compartments and in whole worm tissue.....	116
3.1	Effects of organic compounds on MTLP accumulation or induction, from Ndayibagira <i>et al.</i> , unpublished	156
3.2	Correlations between measured variables and Pb/HMX tissue concentration in <i>Eisenia andrei</i>	157
3.3	Correlations between reproduction endpoints responses and MTLP concentrations in <i>the three body</i> compartments and In whole worm tissue.....	158
3.4	Principal component analysis on data obtained after HMX exposure...	159

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

2,4-DNT	2,4-dinitrotoluène
2,6-DNT	2,6-dinitrotoluène
AAS	Atomic Absorption Spectrophotometry
ACN	Acétonitrile
ACP	Analyse en composantes principales
Ap	Antipain (antiprotéinase)
ASQG	Recommandation pour la qualité des sols voué a l'agriculture, ou en anglais "Agrarian Soil Quality Guideline"
ARNm	Acide RiboNucleique messenger
BAF	Facteur de bioaccumulation, de l'anglais "BioAccumulation Factor"
BSA	Albumine bovine sérique
CCME	Conseil canadien des ministres de l'environnement
CCRMP	Projet Canadien de matériaux de références certifiés, de l'anglais "Canadian Certified Reference Materiel Project"
Cd	Cadmium
CEAEQ	Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec
CEPA	Canadian Environmental Protection Act
CE ₂₀	Concentration effective pour 20% des organismes soumis à l'essai
CE ₅₀	Concentration effective pour 50% des organismes soumis à l'essai

CEQG	Recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement ou en anglais "Canadian Environmental Quality Guidelines"
CL ₅₀	Concentration létale pour 50% des organismes soumis à l'essai
CLAWR	Cold Lake Air Weapons Range
CMEO	Concentration Minimale avec Effet Observé
CPES	Critères préliminaires pour l'eau souterraine (type CCME pour l'eau potable)
CRNC-IRB	Centre National de Recherche du Canada – Institut de Recherche en Biotechnologie
CSEO	Concentration Sans Effet Observé
CSEMD	concentration dans le sol pour l'entraînement militaire durable
DL	Limite de détection, de l'anglais "Detection limit"
DRDC	Development Research, Defense Canada
EC ₅₀	"Effect Concentration 50"
Eco-SSL	Niveaux écologiques de dépistage des sols, de l'anglais "Ecological Soil Screening Levels"
EDTA	Acide éthylènediaminotétraacétique
EREs	Paramètres pertinents d'un point de vue écologique, de l'anglais "Ecologically Relevant Endpoints"
HAPs	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HMX	High Melting eXplosive
ICP-AES	Spectrométrie d'émission atomique couplée au plasma par induction, de l'anglais "Inductively coupled plasma– atomic emission spectrometry"
ICP-MS	Spectrométrie de masse couplée au plasma par induction, de l'anglais "Inductively coupled plasma-mass spectrometry"

ISQG	Recommandation pour la qualité des sols industriels, de l'anglais "Industrial soil quality guideline"
LC ₅₀	"Lethal Concentration 50"
LCPE	Loi Canadienne de Protection de l'environnement
LOEC	"Lowest Observed Effect Concentration"
MBG	Valeur moyennes aux alentours de la zone contaminée, de l'anglais "Mean Background Value"
ME	Matériaux énergétiques
MeOH	Méthanol
MDDEP	Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs
MRE	Éléments de réponse des MTs, de l'anglais "Metallothionein Response Element"
MT	Métallothionéine
MTF	Facteur de transcription des MTs, de l'anglais "Metallothionein Transcription Factor"
MTLP	Protéine de type métallothionéine, de l'anglais "Metallothionein-like Protein"
MTLP-SBD	Complexe réalisé entre les MTLP et le SBD-F
MTmRNA	ARN messager codant pour une métallothionéine
M.W.	Masse moléculaire, de l'anglais "Molecular weight"
NG	Nitroglycérine
NOEC	No Observed Effect Concentration
NRC-INMS	Conseil national de recherches- Institut des étalons nationaux de mesure ou en anglais "National Research Council- Institute for National Measurement Standards"

NRC-BRI	Conseil national de recherches - Institut de recherche en biotechnologie ou en anglais "National Research Council-Biotechnology Research Institute"
Pb	Plomb
PCA	"Principal component analysis"
PepA	Pepstatin A (antiprotéinase)
PNO	Composé polynitro-organique
RDDC	Recherche et développement, Défense Canada
RDX	Research Department eXplosive
RP-HPLC	Chromatographie liquide de haute performance en phase inversée, de l'anglais "Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography"
RQE	Recommandations pour la qualité de l'environnement
RQSEM _E	Recommandations de qualité des sols pour l'entraînement militaire en fonction de l'environnement (ou écologiques)
RQSEM _{ES}	Recommandations de qualité des sols pour l'entraînement militaire en fonction de l'eau souterraine utilisée comme eau potable
RQSEM _S	Recommandations de qualité des sols pour l'entraînement militaire en cas de contact direct avec le sol
RQSEM _{SH}	Recommandations de qualité des sols pour l'entraînement militaire en fonction de la santé humaine
RQSEM _{VA}	Recommandations de qualité des sols pour l'entraînement militaire en fonction de l'eau souterraine pour la protection de la vie aquatique
RTA	Range Training Area

SERDP	"Strategic Environmental Research and Development Program"
SBD-F	7-Fluorobenzofurazan-4-sulfonic acid ammonium salt
SCMTS	Soil Concentrations for Military Training Sustainability
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TNT	Trinitrotoluène
USEPA	Agence de protection environnementale des États-Unis, de l'anglais "United States Environmental Protection Agency"
UV	Ultraviolet
UXO	UneXploded Ordnance
WHC	Capacité de rétention d'eau, de l'anglais "Water holding capacity"

LISTE DES SYMBOLES

μg	microgramme
mg	milligramme
g	gramme
kg	kilogramme
μl	microlitre
ml	millilitre
L	litre
cm^2	centimètre carré
nm	nanomètre
min	minute
h	heure
$\%$	pourcentage
ε	coefficient d'extinction molaire
$^{\circ}\text{C}$	degré Celsius

RÉSUMÉ

De nombreux sites militaires des Forces Armées Canadiennes sont contaminés par des métaux lourds (en particulier Pb et Cd) et des substances énergétiques (en particulier HMX). Ceux-ci entrent dans l'environnement lors de l'utilisation de munitions. Le ver *Eisenia andrei* est considéré comme une espèce sentinelle pertinente lors de l'étude de la pollution des sols. Des tests standardisés utilisant des paramètres tels que la létalité, la croissance et la reproduction de ce ver ont été développés afin d'évaluer les effets létaux et sublétaux de contaminants environnementaux. La métallothionéine (MT) est une protéine ubiquitaire impliquée dans la liaison, la bioaccumulation, le transport, le métabolisme et la détoxification des métaux. Son induction directe par certains métaux bivalents est bien reconnue et plusieurs groupes explorent son utilisation potentielle comme biomarqueur. D'autres facteurs exogènes et endogènes induiraient également l'expression de la métallothionéine de façon indirecte. Les objectifs de cette étude sont d'évaluer la possibilité d'utiliser les protéines de type métallothionéine (MTLPs) comme biomarqueur d'effet précoce par la recherche de relations statistiques entre la reproduction et la modulation de ces protéines suite à une exposition à deux métaux lourds (Pb et Cd) et au HMX. Les outils mis à disposition sont le suivi des paramètres standards après exposition (létalité, croissance et reproduction) et la mesure des MTLPs dans les organes impliqués dans la reproduction, soit les segments 9 à 15 (gonades) et 32 à 37 (clitellum), de même que dans les tissus non impliqués dans la reproduction du ver *E. andrei*. La technique expérimentale utilisée pour la mesure des MTLPs est la chromatographie liquide de haute performance en phase inverse (HPLC-RP) et en mode isocratique (phase mobile $K_2HPO_4/ACN/MeOH$, 80 : 18 : 2).

Les résultats obtenus confirment que les deux métaux sont effectivement toxiques et létaux pour *E. andrei* et que les trois contaminants (Cd, Pb et HMX) présentent des effets délétères et dose-dépendants sur la reproduction du ver. De plus, nous constatons qu'une accumulation de MTLP induite par le Cd est corrélée avec une diminution de la reproduction du ver. Concernant le Pb, aucune induction significative de MTLPs n'a été observée, laissant ainsi ouverte la question de sa relation avec les MTLPs. Enfin, la segmentation des vers a permis d'entrevoir certains effets du HMX sur les MTLPs, effets indétectables au niveau du ver entier. Pour conclure, la présente étude démontre que l'induction des MTLPs chez le ver de terre constitue une réponse physiologique tout au moins à certains métaux ainsi qu'à

une substance organique (HMX); la perspective d'utiliser cet outil comme biomarqueur est donc prometteuse. De plus, cette étude confirme la pertinence de classer les métaux lourds en deux groupes selon leurs mécanismes de rétention et de détoxification. Quant à la détoxification du HMX chez *E. andrei*, il pourrait s'agir d'un autre mécanisme de défense cellulaire qui agirait de manière indirecte sur les MTLPs.

Mots-clés : métallothionéine, cadmium, HMX, plomb, reproduction, *Eisenia andrei*, compartiments, biomarqueur

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les sites militaires d'entraînement (Range and Training Areas, RTA) des Forces Armées Canadiennes sont contaminés par des composés énergétiques comme l'octahydro-1,3,5,7-tétranitro-1,3,5,7-tétrazocine (HMX), ainsi que par divers métaux lourds tels que le cadmium (Cd) et le plomb (Pb). La contamination de l'environnement par les explosifs et les métaux se produit tout le long du cycle de vie des munitions depuis leur production, leur entreposage, leur utilisation/manipulation et leur élimination. Les explosifs sont utilisés comme agents propulseurs ou détonants dans les munitions (Yinon, 1990; Card et Autenrieth, 1998 ; Sunahara *et al.*, 2009), tandis que les métaux proviennent le plus souvent de l'enveloppe de celles-ci (Robidoux *et al.*, 2004b). La contamination des sols de RTA par les métaux et les composés énergétiques est hétérogène et localisée, constituant des points chauds de contamination auxquels sont associées de très fortes concentrations en contaminants (Philips *et al.*, 1993; Marois *et al.*, 2004; Thiboutot *et al.*, 2004; Ampleman *et al.*, 2004). De plus faibles concentrations sont observables autour de ces points chauds. Les composés énergétiques se présentent à ces endroits sous forme de résidus et/ou de produits de dégradation. Les métaux, quant à eux, sont majoritairement présents sous forme de projectiles (*e.g.* plombs), de fragments d'obus et d'enveloppes de munitions corrodées. De plus, les concentrations de ces contaminants dans les sols de RTA dépassent fréquemment les recommandations du CCME pour les métaux présents dans les sols industriels (CCME, 2006) et les critères pour les explosifs récemment proposés (Robidoux *et al.*, 2006 , Kuperman *et al.*, 2007 ; Lachance *et al.*, 2008). Les concentrations en composés énergétiques et en métaux dans les échantillons de sol prélevés sur les RTA (Philips *et al.*, 1993; Marois *et al.*, 2004; Thiboutot *et al.*, 2004; Ampleman *et al.*, 2004) excèdent aussi

fréquemment les seuils de toxicité établis dans la littérature pour les organismes du sol (Efroymson *et al.*, 1997; Robidoux *et al.*, 2000a, 2002b, 2004a, 2004b).

Les métaux lourds comme le Cd et le Pb provoquent des effets néfastes sur la survie, la croissance et la reproduction des vers de terre (notamment une baisse de fertilité ainsi qu'une moindre abondance de cocons et de juvéniles) (Efroymson *et al.*, 1997). Le HMX n'est pas létal mais il provoque certains effets sous-létaux, en particulier sur la reproduction du ver *E. andrei* (Robidoux *et al.*, 2000b, 2001, 2002b; Savard *et al.*, 2005). Il a été suggéré que le HMX pouvait potentiellement être un producteur de stress oxydant via la production d'agents alkylants ou ROs (Savard *et al.*, 2005, 2007; Berthelot *et al.*, 2008a). Une induction des métallothionéines (MTs) constituerait une réponse à ce type de stress. (Klaassen *et al.*, 1999; Ndayibagira *et al.*, 2007). Les MTs sont des protéines de faible poids moléculaire liant les métaux; elles sont impliquées dans le transport, la séquestration et l'élimination de certains ions métalliques (Klaassen, 1995). Leur présence sous diverses isoformes dans tous les organismes vivants et leur implication dans le transfert de métaux essentielles vers le centre actif de certaines enzymes métal-dépendantes font des MTs des métalloprotéine ubiquitaire (Suzuki *et al.*, 1993, Roesijadi, 1994b, Lagadic *et al.*, 1997, 1998). La liaison des métaux par les MTs et l'induction de la synthèse des MTs constituent donc un mécanisme de défense vis-à-vis du stress provoqué suite à une exposition aux métaux. Leur utilisation comme biomarqueur constituait une piste intéressante (Kammenga *et al.*, 2000; Scott-Fordsman et Weeks, 2000; Ndayibagira *et al.*, 2007). L'expression et la quantification des MTs dans les tissus biologiques sont dorénavant considérés comme des biomarqueurs d'effet biologique précoce ou de défense à la présence des métaux (Gagné et Blaise, 2005b). De nombreuses études sur cette utilisation potentiel des MTs en Ecotoxicologie ont été réalisées chez des espèces aquatiques (Roesijadi, 1994a, 1994b) et terrestres (Spurgeon *et al.*, 2004b), notamment chez *E. andrei*. (Ndayibagira *et al.*, 2007).

Les gouvernements canadien et américain subventionnent présentement des recherches pour caractériser la toxicité et le potentiel de bioaccumulation des

substances énergétiques telles que le HMX. D'autres travaux de recherches s'intéressent à la toxicité des métaux tels que le Cd et le Pb. Dans ce contexte, un projet de collaboration entre le département de Recherche et Développement – Défense Canada (RDDC) de la Défense Nationale et le groupe d'Écotoxicologie Appliquée de l'Institut de Recherche en Biotechnologie (IRB) – Conseil national de Recherche du Canada (CNRC) a été établi de 2002 à 2005 afin d'étudier les sols de RTA contaminés. Brièvement, il s'agissait d'étudier la biodisponibilité de tels contaminants dans ces sols et de définir les interactions possibles entre les polluants par le biais d'outils chimiques et biologiques. Ceci a pu être réalisé en suivant la modulation des indicateurs de toxicité globale (létalité, croissance et reproduction) et celle de biomarqueurs reconnus comme la superoxyde dismutase (SOD), la Gluthation-S-transférase (GST), la catalase ou la fragilité des membranes lysosomiales (temps de rétention du rouge neutre; TRRN), ou potentiels comme les MTs. L'espèce sentinelle retenue pour ces études est le ver *E. andrei* : pour de nombreuses raisons, celle-ci est reconnue comme étant un organisme pertinent pour les recherches sur les écosystèmes terrestres lors d'études en laboratoire ou sur le terrain (Edwards et Bohlen, 1992, 1996; Ribera et Saint-Denis, 1999; Lanno *et al.*, 2004). Plusieurs étudiants de cycles supérieurs ont contribué à ce projet tout en prenant des directions différentes. Kathleen Savard, étudiante à la Maîtrise en Biologie à l'UQAM s'est intéressée aux effets combinés des mélanges explosifs/métaux et a étudié les effets sous-létaux du HMX et du Pb en particulier grâce aux indicateurs standards et aux biomarqueurs du stress oxydant (Savard *et al.*, 2005; 2007). Aurélie Auroy, étudiante dans le même programme, a examiné les effets de ces substances toxiques sur une batterie de biomarqueurs cellulaires du ver de terre (fragilité de la membrane lysosomiale, activité de la phosphatase acide et potentiel de phagocytose) (Auroy *et al.*, en préparation). Yann Berthelot, candidat au doctorat en Sciences de l'Environnement à l'UQAM, a étudié, entre autres, la biodisponibilité du Pb et du HMX dans les sols (Berthelot *et al.*, 2008a ; 2008b ; 2009). La présente étude vise l'exploration de l'utilisation des protéines de type métallothionéine (MTLPs) chez *E. andrei* afin d'évaluer la qualité des sols des RTA contaminés. Nous avons réalisé la segmentation du corps du ver de terre en trois

parties distinctes (gonades, clitellum et tissus non reliés à la reproduction), dans le but d'étudier les relations entre la mobilisation des MTLPs dans les différents tissus et les effets sur la reproduction après une exposition au Cd, au Pb et au HMX. La portion "gonades" est constituée des segments 9 à 15 et comprend tout le matériel reproductif : gonades, vésicules séminales et oviductes. La portion "clitellum" comprend les segments 32 à 37 et est constituée du clitellum, organe montrant la maturité sexuelle des vers et impliqué dans la sécrétion du cocon (Jamieson, 1981).

Les objectifs principaux consistent premièrement à confirmer la toxicité du Cd, du Pb et du HMX envers *E. andrei* en utilisant des paramètres pertinents d'un point de vue ecotoxicologique comme la reproduction, les changements de poids et la létalité; deuxièmement de savoir si les modulations des MTLPs dans les différentes portions du ver *E. andrei* exposé à un environnement contaminé peuvent être associée aux effets de la substance sur la reproduction ; et finalement à évaluer l'utilisation potentielle des MTLPs comme biomarqueur d'effet biologique précoce ou de défense à la présence des métaux dans les tissus biologiques.

Les hypothèses clés à vérifier sont : 1) la synthèse de MTLPs est induite de façon dose-dépendante chez *E. andrei* en fonction de la concentration en métaux présents tant dans l'environnement extérieur que dans les différents tissus de ver; 2) les concentrations tissulaires de MTLPs sont modulées par les concentrations de HMX rencontrées dans les sols contaminés; 3) la possible induction de MTLPs par les métaux et par le HMX dans les différents tissus de vers est corrélée avec la réponse d'un ou plusieurs paramètres d'effet chronique (croissance ou reproduction).

L'approche met à contribution des outils chimiques (concentrations des substances étudiées dans les sols et les tissus de vers), biologiques (paramètres de toxicité standard) et biochimiques (concentrations en MTLPs dans les tissus). Un sol naturel sablonneux et sain, typique des RTA et provenant de la base militaire de Valcartier (QC, Canada), a été utilisé pour réaliser les tests de reproduction en sol

amendé. Lors de ces expériences, le Pb, le Cd et le HMX ont été retenus non seulement en tant que contaminants représentatifs du milieu à l'étude mais aussi en raison d'une différence probable dans les mécanismes de détoxification sollicités.

Ce mémoire de maîtrise présente les résultats obtenus lors de ces investigations. L'état des connaissances fait d'abord l'objet d'un premier chapitre. Les résultats biologiques et chimiques obtenus après exposition au Cd sont ensuite présentés dans un deuxième chapitre sous forme d'un article en anglais. Enfin, les résultats biologiques et chimiques obtenus après exposition au Pb et HMX seront présentés dans un troisième et dernier chapitre, également sous forme d'un article en anglais.

CHAPITRE I

ETAT DES CONNAISSANCES

1.1 Organisme à l'étude : le ver de terre *E.andrei*

1.1.1 Biologie du ver de terre

Le ver de terre, ou lombric, appartient à la classe des oligochètes dans le *phylum* des annélides. Un des traits distinctifs de cette famille est la segmentation ou la métamérisation, soit la division de l'organisme en parties similaires, ou segments, disposés en série le long de l'axe antéro-postérieur. Lors de l'évolution, on a pu assister à une spécialisation régionale : le corps du ver s'est divisé de façon grossière en une tête, un thorax et un abdomen. La tête, ou acron, représentée par le *prostomium* (bouche) contient le cerveau, alors que le *pygidium*, ou telson, est la partie terminale du corps qui forme l'anus (Ruppert et Barnes, 1994). Outre l'acron et le *pygidium*, les vers possèdent un nombre variable de segments intermédiaires. Chez les espèces segmentées de façon quasi parfaite, les muscles, les cordons nerveux et les ganglions (système nerveux), les vaisseaux sanguins, le coelome, les systèmes excréteur (néphrostome et néphridiopore) et reproducteur (testicules et ovaires) sont répliqués dans chaque segment (Ruppert et Barnes, 1994). On a suggéré que l'un des avantages de la segmentation repose sur la division de l'organisme en une série de compartiments pouvant être régulés de manière plus ou moins indépendante (Ruppert et Barnes, 1994). Toutefois, en observant la locomotion des annélides, le zoologiste anglais R. B. Clark développa une autre

explication sur la signification de la segmentation. Son idée, appelée théorie de l'enfouissement ("burrowing theory"), établit que la segmentation du coelome permet au ver de s'enfouir et de creuser de façon plus efficace qu'un ver non segmenté (Ruppert et Barnes, 1994). Un grand avantage de la métamérisation consiste à permettre un certain mouvement péristaltique qui facilite le déplacement de l'animal dans les sols. Des muscles longitudinaux et circulaires, des muscles rétracteurs ainsi que la présence de soies sur l'animal facilitent ce type de mouvement (Morin et Houseman, 2003).

Les annélides possèdent une cavité du corps appelée coelome. L'apparition de cet espace qui entoure l'intestin et qui le sépare des parois du corps représente un important développement dans l'histoire de l'évolution des invertébrés (Wallwork, 1983; Hickman *et al.*, 1996). En effet, la présence du coelome fournit de l'espace pour les organes viscéraux et offre ainsi une meilleure flexibilité au ver de terre puisqu'il est rempli de liquide. Ce liquide, appelé liquide coelomique, joue le rôle d'un squelette hydrostatique permettant au ver de mieux se mouvoir et de creuser. Le liquide coelomique possède également plusieurs autres fonctions : il transporte les gaz et les matières nutritives (transport interne), il fournit des liquides pour le processus d'excrétion des déchets (transport externe) et il est le site de maturation des gamètes et de la fabrication des embryons (Ruppert et Barnes, 1994). De façon typique, le coelome est composé de nombreuses paires de chambres (gauche et droite) séparées par des cloisons, les *septa* (Ruppert et Barnes, 1994). Chaque septum est composé de deux couches de péritoine, l'un provenant du segment postérieur à la jonction et l'autre provenant du segment antérieur à la jonction, ainsi que d'une couche de tissu connectif entre les deux (Ruppert et Barnes, 1994). Chez la plupart des vers de terre, chaque compartiment coelomique (à l'exception des extrémités) est connecté à l'extérieur par un pore médiadorsal débouchant par un sphincter. Ces pores expulsent le fluide coelomique, ce qui aide à maintenir l'humidité de la peau du ver. Lorsqu'ils sont stressés, certains vers de terre rejettent ce fluide vers l'extérieur (Ruppert et Barnes, 1994).

L'intestin du ver de terre se présente sous la forme d'un tube droit reliant la bouche et l'anus et est divisé en canal alimentaire antérieur et postérieur. Cet organe est le principal lieu de digestion et d'absorption. La nourriture y circule principalement par l'action péristaltique des muscles de l'intestin. Des cellules d'entreposage spécialisées (cellules chloragogènes ou chloragocytes) dérivent de l'épithélium coelomique et sont associées à la paroi de l'intestin (figure 1.1). Elles forment le tissu chloragogène qui présente plusieurs fonctions dont l'accumulation des déchets produits par la digestion (Jamieson, 1981; Hopkin, 1989). Ces déchets peuvent entre autres inclure les métaux qui seront éventuellement emmagasinés dans les chloragosomes (ou granules) des chloragocytes (Ireland 1978; Hopkin, 1989; Morgan et Morgan, 1989; Morgan *et al.*, 1999). Les chloragosomes peuvent ensuite être déchargés dans le liquide coelomique et être excrétés par les néphridies (principaux organes d'excrétion présents en paires dans chaque segment) ou encore être emmagasinés de façon permanente avec d'autres produits d'excrétion dans des nodules à déchets situés dans des sacs coelomiques de la partie postérieure du ver.

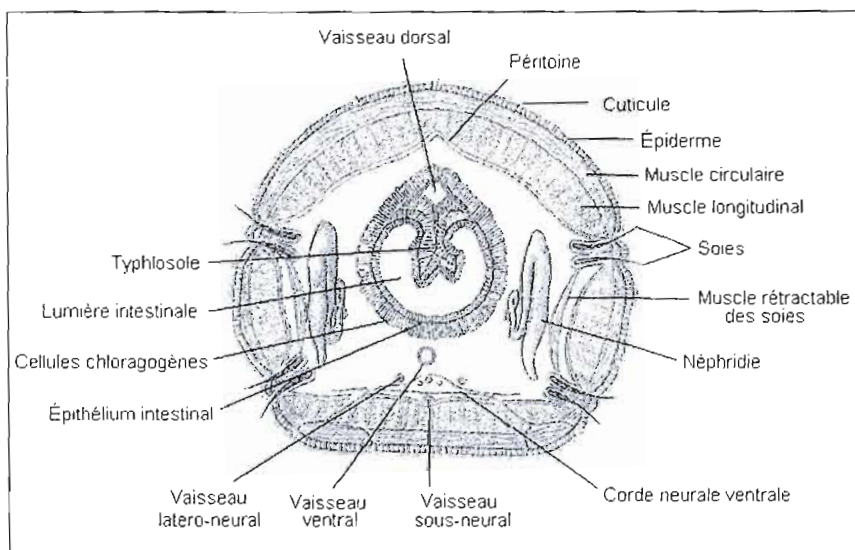


Figure 1.1. Coupe transversale d'un ver de terre. Image tirée de Hickman *et al.* (1996) et traduite de l'anglais.

La compartimentation du corps chez les annélides entraîne cependant d'importantes répercussions sur l'arrangement des organes. En effet, puisque chaque segment est isolé, la présence de vaisseaux sanguins, de nerfs, de ganglions et d'organes excrétoires (néphridies) est requise dans la plupart des segments (figure 1.1 et 1.2) (Wallwork, 1983).

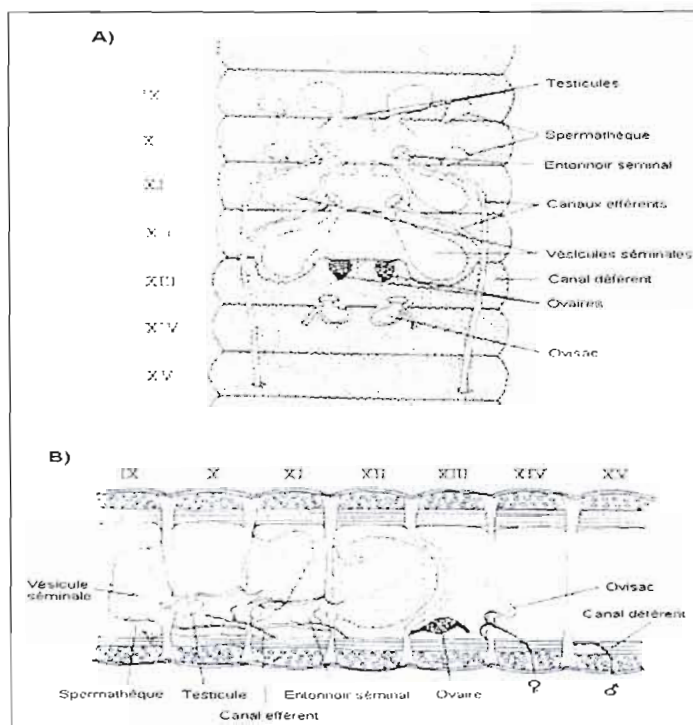


Figure 1.2. Système reproducteur du ver de terre. A) coupe dorsale ; B) coupe longitudinale. Image tirée de Wallwork (1983) et traduite de l'anglais.

Chez les annélides, certaines structures segmentaires sont ainsi réduites à seulement quelques segments. Par exemple, les gonades sont limitées à quelques segments génitaux spécialisés (Ruppert et Barnes, 1994). En effet, le système reproducteur occupe les segments 9 à 15 et 32 à 37. Le ver de terre est hermaphrodite, c'est-à-dire qu'il possède des organes mâles et femelles. Les différents gamètes sont cependant séparés afin d'éviter l'autofécondation. Les pores génitaux femelles (figure 1.2) sont situés dans le segment 14, tandis que les pores

génitaux mâles (figure 1.2) dans le segment 15. La reproduction dioïque permet une grande variabilité génétique. Les segments 9 à 15 comportent tout le matériel reproducteur, c'est-à-dire les testicules et les ovaires, les vésicules séminales ainsi que les oviductes. Le système de reproduction mâle est composé de deux paires de testicules et de deux paires d'entonnoirs séminaux lesquels sont entourés par trois paires de vésicules séminales (figure 1.2). Le sperme, provenant des testicules, mature à l'intérieur des vésicules séminales puis passe ensuite dans les entonnoirs séminaux pour être conduit jusqu'aux gonopores mâles. Le système reproducteur femelle est quant à lui composé d'une paire d'ovaires qui se situe directement dans la cavité coelomique (figure 1.2). Les œufs libérés par les ovaires sont captés par des oviductes puis sont transportés jusqu'aux gonopores femelles.

Lors de l'accouplement, le sperme des deux individus est échangé et emmagasiné dans des réceptacles appelés spermathèques (figure 1.3 A). Les segments 32 à 37 sont élargis en un clitellum, soit un développement glandulaire de l'épiderme montrant la maturité sexuelle du ver et impliqué dans la sécrétion de la capsule de l'œuf ou cocon au moment de la ponte (figure 1.3) (Hickman *et al.*, 1996; Morin et Houseman, 2003). Par la suite, chacun des vers secrète un tube de mucus qui formera un cocon autour de son clitellum. Lorsque l'enveloppe de mucus passe par les gonopores femelles, des œufs sont déversés à l'intérieur (figure 1.3 B). Du sperme est ensuite relargué des spermathèques à l'intérieur du cocon (figure 1.3 C). Ainsi, la fertilisation est essentiellement externe. Lorsque le cocon quitte le ver, chaque bout du tube se referme et le cocon se retrouve dans le sol (figure 1.3 D et E). Lors de l'éclosion, un même cocon produira plusieurs juvéniles (Wallwork, 1983; Hickman *et al.*, 1996). Les clitellés sont ainsi identifiés par cette modification de leur épiderme, le clitellum, qui est situé derrière les pores femelles du ver (Jamieson *et al.*, 1981). Une innovation majeure du point de vue de l'évolution des vers de terre a été le développement de ce clitellum consistant en plusieurs couches de cellules ayant la capacité de sécréter de grandes réserves de protéines dans les cocons afin d'aider au développement des embryons et des juvéniles (Jamieson *et al.*, 1981). Dans le clitellum de *E. andrei*, pendant la puberté, la concentration de protéines

totales diminue, cependant la quantité de protéines solubles augmente (Jamieson *et al.*, 1981). Ainsi, les vers adultes avec un clitellum bien développé possèdent de grandes réserves de protéines solubles dans cette partie du corps. Dans les cocons, le développement des embryons est corrélé avec une augmentation des protéines totales et des protéines solubles (Jamieson *et al.*, 1981). En résumé, la présence d'un clitellum, de l'hermaphrodisme, du dépôt des œufs dans un cocon et la restriction des gonades à quelques segments génitaux sont des signes distinctifs propres aux oligochètes (Ruppert et Barnes, 1994)

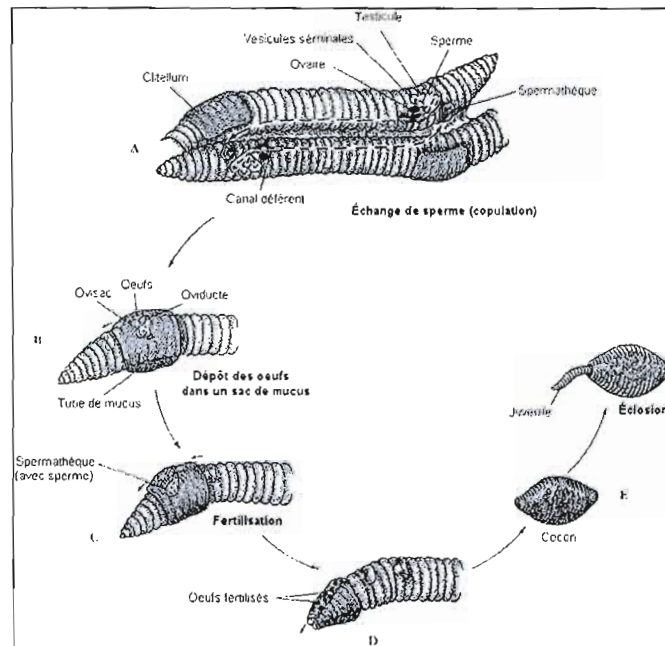


Figure 1.3. Accouplement et reproduction du ver de terre. Image tirée de Hickman *et al.* (1996) et traduite de l'anglais.

1.1.2 Distribution des vers de terre

Les sols présentant beaucoup de matière organique, ou du moins une couche d'humus à la surface, contiennent la plus grande faune de vers. Cependant, d'autres facteurs physiques des sols sont importants quant à la distribution de ces espèces terrestres. Les sols acides sont les habitats préférés de la plupart des vers

de terre. Une section longitudinale à travers un sol révèle une stratification verticale des vers de terre. Si les plus gros vers peuvent s'enfouir à plusieurs mètres sous la surface, la distribution des jeunes vers et des petites espèces est réduite à quelques centimètres de la couche d'humus. On observe ainsi une distribution limitée au niveau le plus élevé du sol qui contient le plus de matière organique (Ruppert et Barnes, 1994).

1.1.3 Importance écologique

Comme Darwin (1809-1882) l'a démontré, l'activité des vers de terre a des effets bénéfiques sur les sols. De par leur importante biomasse et en raison de leur place dans la chaîne alimentaire ainsi que dans la formation, l'aération et le maintien du sol, les vers de terre sont des éléments incontournables et essentiels dans un écosystème (Ruppert et Barnes, 1994). Ils sont présents dans tous les types de sols (forêts, prairies, savanes, pâturages, etc.) à l'exception des milieux extrêmes (glaciers, déserts, sols très acides ou très salés, etc.) et ils représentent de 60% à 80% de la biomasse animale du sol (Edwards et Bohlen, 1992; Rida, 1994). Le rôle écologique important des vers provient de leur comportement. Ils se nourrissent essentiellement de débris végétaux et de matière organique incorporée dans le sol et occasionnellement de matière organique vivante comme des champignons ou bactéries (Edwards et Bohlen, 1992; Rida, 1994; Scott-Fordsmand et Weeks, 2000). Les lombrics favorisent aussi l'entrée d'eau, d'air et de racines en creusant d'importants réseaux de galeries, améliorant ainsi l'aération et le drainage du sol (Edwards et Bohlen, 1992; Rida, 1994; Efrøymson *et al.*, 1997). L'activité de brassage des sols résultant du déplacement des vers et de leur quête de nourriture favorise également le transport et le mélange des différents composants du sol. Les vers créent ainsi un milieu favorable pour les micro-organismes décomposeurs comme certains champignons et bactéries, augmentant aussi la fertilité des sols (Edwards et Bohlen, 1992; Rida, 1994). De plus, ils représentent une importante source de protéines pour de nombreux animaux, aussi bien vertébrés qu'invertébrés (Ireland, 1983; Cooke *et al.*, 1992; Rida, 1994; Efrøymson *et al.*, 1997).

1.1.4 Utilisation du ver de terre comme bioindicateur

En plus de leur vaste distribution et de leur importance écologique, plusieurs éléments font du ver de terre un bon candidat pour l'étude de la contamination de l'écosystème terrestre. Cet organisme est en effet en contact direct et constant avec le sol. La surface externe de son épiderme est très vascularisée, ce qui permet une entrée directe des contaminants présents dans le milieu, lors d'un processus très semblable à l'absorption pulmonaire chez les organismes supérieurs. Son mode alimentaire fournit également une autre porte d'entrée aux contaminants via l'ingestion de particules de sol (Lanno *et al.*, 2004). Ces animaux peuvent donc être contaminés par des éléments exogènes suite à une exposition cutanée ou par ingestion (Vijver *et al.*, 2003). Plusieurs études ont démontré que les vers bioaccumulent et bioconcentrent les contaminants (Hopkin, 1989). Ces derniers peuvent alors être distribués vers des niveaux trophiques supérieurs via la chaîne alimentaire car les vers sont des proies de choix pour le nombreux animaux (Cooke *et al.*, 1992; Edwards et Bohlen, 1992). De plus, des modifications chimiques peuvent survenir dans le tractus alimentaire du ver pouvant rendre les contaminants plus disponibles pour les plantes. La décomposition et la minéralisation de vers morts peuvent aussi entraîner un relargage des contaminants bioaccumulés dans l'environnement (Ireland, 1975, 1983). La reproduction du ver de terre peut aussi être altérée par la présence d'un stress dans son environnement. Le succès reproductif du ver de terre peut effectivement être compromis par l'action directe d'un contaminant, mais également par un changement de distribution énergétique en réponse à un stress (Morgan *et al.*, 1999). En effet, différents mécanismes au coût énergétique élevé sont mis en place chez l'organisme dans l'espoir de s'acclimater ou de s'adapter aux stress auxquels il est soumis (Postma *et al.*, 1995). De ce fait, la proportion d'énergie disponible chez l'animal pour la production de biomasse (croissance et/ou reproduction) peut être réduite. Les organismes invertébrés du sol peuvent donc être utilisés comme des éléments bioindicateurs de la contamination d'un écosystème terrestre (Morgan et Morgan, 1988 ; Dallinger, 1994). De plus, les vers de terre sont reconnus comme étant des outils de biosurveillance efficaces

(Ribera et St-Denis, 1999), en particulier pour mesurer les effets des métaux (Morgan et Morgan, 1988; Edwards et Bohlen, 1992 ; Dallinger, 1994), des pesticides et des HAPs (Edwards et Bohlen, 1992 ; Booth *et al.*, 2000) et des explosifs (Robidoux *et al.*, 2000a à 2005). Les invertébrés et en particulier les vers de terre sont autant utilisés lors de travaux en laboratoire que lors d'expérimentations *in situ*. Sur le terrain, on utilise des mésocosmes afin de permettre aux vers d'évoluer dans les milieux naturels tout en étant récupérables à la fin de l'expérience pour des analyses (Robidoux *et al.* 2004b, Robidoux *et al.* 2005). Dans une brève revue de littérature, Furst (2002) rappelle que les niveaux de toxicité relative du Cd chez les vers sont comparables à ceux obtenus chez le rat (Nguyen et Furst, 1988) et que la même observation s'applique quant aux effets d'autres ions métalliques chez le ver de terre. Les vers de terre constituent donc une bonne alternative à l'utilisation de mammifères lors d'études sur la toxicité des métaux en laboratoire.

1.1.5. Choix de l'espèce : *Eisenia andrei*

L'espèce *Eisenia andrei* appartient à la classe des oligochètes et à la famille des annélides. Elle se retrouve principalement dans les sols très organiques ou dans le compost. L'espèce *E. andrei* est un bon modèle pour l'évaluation de la toxicité des contaminants par voie cutanée et intestinale même si elle ne représente pas une proportion majeure de la biomasse des sols (Ribera et Saint-Denis, 1999). Toutefois, le court cycle de vie d'*E. andrei* (maturité atteinte en 7 à 8 semaines; figure 1.4) et son importante fécondité (2-5 cocons/ver/semaine pouvant produire plusieurs juvéniles; figure 1.4) permettent d'étudier assez facilement les effets des contaminants sur les vers adultes et sur la reproduction de première et même de seconde génération (Venter et Reinecke, 1988; Edwards et Bohlen, 1992; Efrogmson *et al.*, 1997). De plus, *E. andrei* fait partie de la catégorie des vers épigés (Wallwork, 1983; Rida, 1994) : puisque les lombrics épigés vivent à la surface du sol, ils sont ainsi moins protégés et sont facilement victimes de prédateurs et des

polluants. Autre avantage non négligeable, *E. andrei* peut facilement être cultivé en laboratoire dans des conditions contrôlées (humidité, température, nourriture...) et est tolérant à une variété de types de sol (Edwards et Bohlen, 1992; Efroymsen *et al.*, 1997; Svendsen *et al.*, 2002; Lanno *et al.*, 2004). *E. andrei* occupe également une fonction importante dans la dégradation de la matière organique et les processus d'humidification (Rida, 1994). De plus, les bases de données toxicologiques et génétiques concernant ce ver en particulier sont importantes, ce qui fait que les effets des principaux polluants sur son développement (notamment sur la reproduction) sont bien connus. *E. andrei* a en effet été choisie par des organismes de réglementation et de protection de l'environnement de par le monde comme bioindicateur de l'écosystème terrestre. Des essais/protocoles de toxicité aiguë et chronique ont notamment été normalisés (OCDE, 1984; USEPA, 1989; ISO, 1993, 1998).

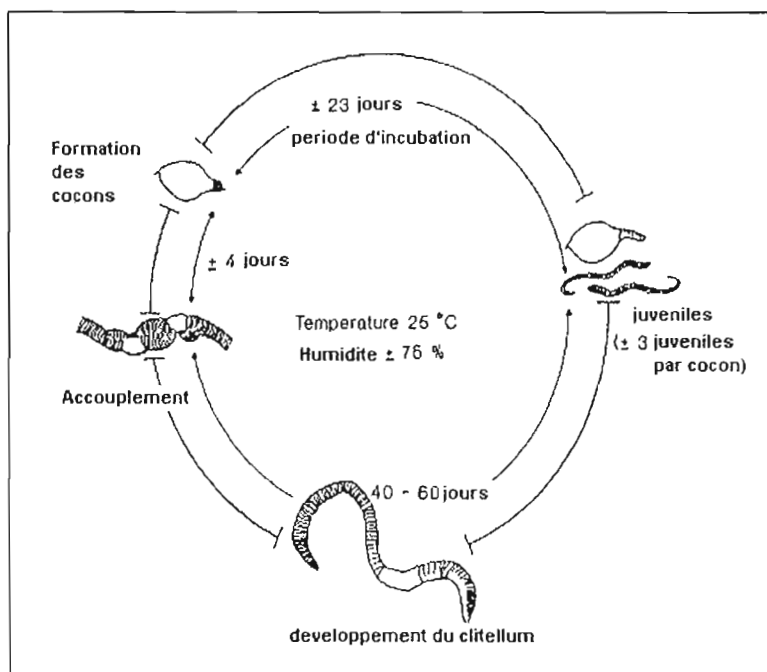


Figure 1.4. Cycle de vie du ver *E. andrei/fetida*, tiré de Venter et Reinecke, 1988 et traduit de l'anglais

1.2 Les Méthallothionéines

1.2.1 Historique

Les recherches scientifiques sur les méthallothionéines (MT) ont commencé il y a plus de 50 ans avec l'isolement par Margoshee et Vallee, en 1957, d'une protéine de rein de cheval capable de complexer le cadmium (Pelletier *et al.*, 2004). Des études ultérieures sur ces protéines ont porté sur d'autres groupes d'animaux, e.g. chez l'homme (Hunziker et Kagi, 1985), chez le rat (Waalkes et Klaassen, 1985) et même chez le ver de terre (Suzuki *et al.*, 1980). Cependant, les fonctions des MTs sont mal cernées et font l'objet de controverses. Le développement des recherches sur les MTs a bénéficié de contributions en biochimie, en médecine humaine et vétérinaire, en nutrition, en pathologie, en cancérologie, en toxicologie et en écotoxicologie (Pelletier *et al.*, 2004). De nos jours, l'intérêt suscité par les MTs demeure élevé (Pelletier *et al.*, 2004). En effet, un nombre élevé de publications récentes porte sur la purification, la caractérisation, la quantification et le potentiel de biomarqueur des MTs chez de multiples espèces terrestres ou aquatiques qui sont pertinentes d'un point de vue écologique.

1.2.2 Caractéristiques et fonctions

1.2.2.1 Propriétés physico-chimiques

Les MTs sont des protéines de faible poids moléculaire (environ 6-7 kDa) capables de lier les métaux essentiels tels le cuivre (Cu) et le zinc (Zn), ainsi que les métaux non-essentiels comme le cadmium (Cd), le mercure (Hg) et l'argent (Ag), sous forme ionique. Elles contiennent une grande proportion de résidus cystéines à groupements fonctionnels libres, permettant ainsi une liaison avec certains métaux (figure 1.5 et 1.6). Nielson *et al.* (1985) ont établi précisément les configurations des liaisons chimiques entre de nombreux métaux et les MTs.

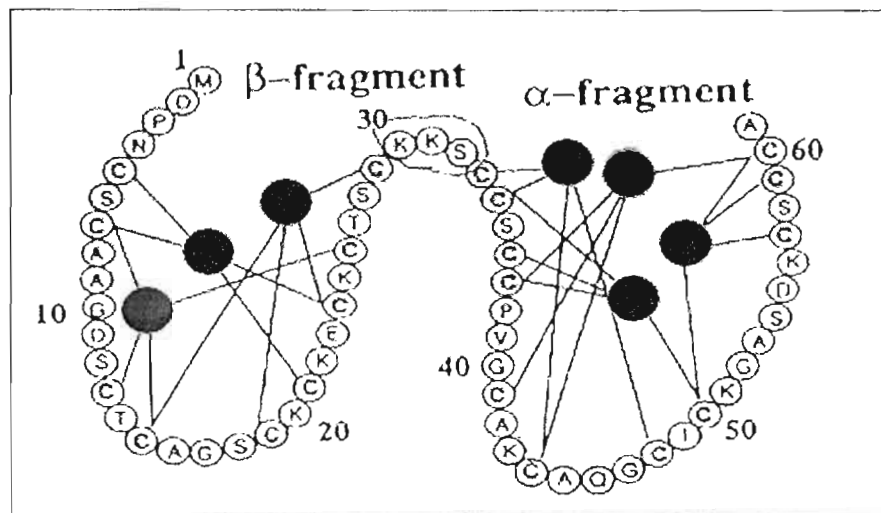


Figure 1.5. Séquence des acides aminés des MTs animale
(image tirée du site Internet du Commission de l'Énergie
Atomique français (CEA), Direction des Sciences du vivant)
[http://www.dsv.cea.fr/content/cea/dep/ddevm/dlep/toxnu1.h](http://www.dsv.cea.fr/content/cea/dep/ddevm/dlep/toxnu1.htm)
tm

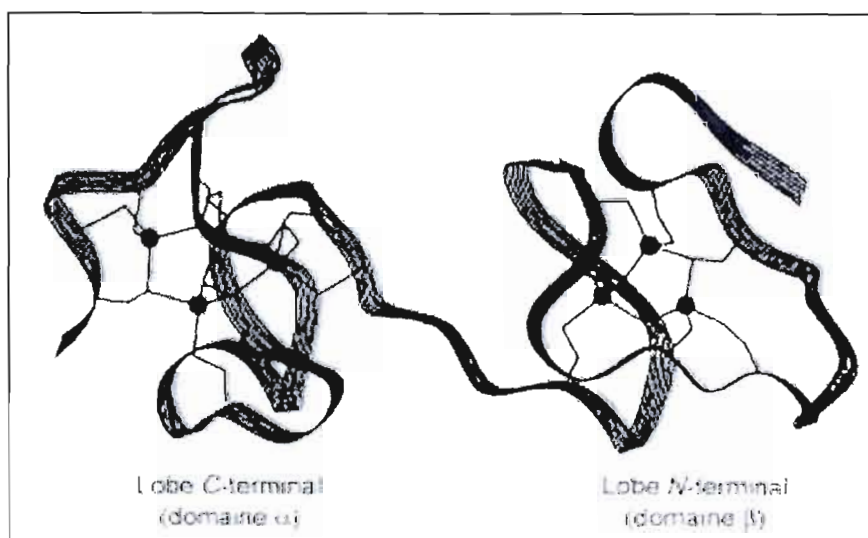


Figure 1.6. Les deux domaines α et β de la Cd_5Zn_2 -MT de Rat
(*Rattus norvegicus*), tiré de Robbins *et al.*, 1991.

1.2.2.2 Rôles physiologiques de la MT

Il est désormais considéré inadéquat de présenter les MTs uniquement comme des biomarqueurs de stress aux métaux. En effet, elles sont impliquées dans l'emmagasiner, le transport et l'échange des métaux essentiels divalents, ainsi que dans leur détoxification (Campbell *et al.*, 1990; Klaassen, 1995). On sait que les MTs jouent un rôle central dans l'homéostasie cellulaire vis-à-vis des métaux essentiels. Elles peuvent les emmagasiner en se liant à eux, les transporter ou les éliminer par le biais du système d'excrétion (Huang et Cody, 1993). Les MTs sont capables de donner les ions Cu et Zn à des molécules réceptrices appropriées comme les métallo-enzymes et certains facteurs de transcription (Roesijadi, 1994a). Elles régulent ainsi les activités dépendantes des métaux grâce à ces interactions moléculaires spécifiques (Roesijadi, 1994a).

Les MTs sont aussi responsables de la détoxification des métaux non essentiels divalents. Il a été démontré que les MTs protègent les cellules de l'organisme des effets toxiques suite à une exposition aux métaux non-essentiels (Klaassen *et al.*, 1995 ; Park *et al.*, 2001). Elles permettraient ainsi l'élaboration d'une réponse physiologique aux métaux lourds et l'induction de diverses autres protéines liant les métaux (Cherian et Goyer, 1978). En tant que protéines solubles présentes dans le cytosol et démontrant *in vitro* une très haute affinité pour les métaux toxiques comme Ag, Cd et Hg, les MTs séquestrent les métaux et réduisent leur biodisponibilité pour les sites biochimiques critiques de la cellule. Les MTs joueraient donc un rôle complémentaire à celui des lysosomes et des granules observés chez les invertébrés (Campbell *et al.*, 1990).

La contamination des écosystèmes terrestres par les métaux est un stress permanent et souvent fort pour les animaux. Ces derniers vivent sur des sites contaminés par des métaux lourds, et tolèrent donc de relativement fortes concentrations de ces métaux. Ils présentent des niveaux basaux de MT plus élevés que chez des animaux vivant dans les zones non-contaminées, dites saines. En

effet, de la tolérance *in situ* vis-à-vis des métaux lourds a été reportée chez des populations de collemboles (*Orchesella cincta*) vivant dans les sols de mines contaminées par les métaux. Cette tolérance vis-à-vis des métaux est en corrélation avec la surexpression du gène de la MT, mais il semblerait toutefois que cette surexpression ne soit pas seul responsable de cette résistance acquise (Timmermans *et al.*, 2005; Roelofs *et al.*, 2007). De la même manière, les descendants de ces animaux seraient capables de vivre sur des sites contaminés alors que les descendants d'animaux vivant dans les zones saines en sont incapables. Wu *et al.* (2006) ont aussi suggéré que l'accumulation de métaux lourds et l'expression de MT pouvaient être en relation avec le phénomène de résistance des poissons aux métaux lourds. Leurs recherches ont révélé que la larve (jeune poisson sortant de l'œuf) du tilapia possède une grande tolérance au Cd quand l'expression de MT est induite après un traitement au Cd. Ces chercheurs s'intéressent dorénavant au rôle qu'aurait l'expression de MT vis-à-vis la tolérance aux métaux lourds acquise chez trois poissons présents dans des rivières polluées de Chine. Ces résultats laissent suggérer que les MTs confèrent une véritable résistance chronique vis-à-vis certains métaux, en plus de leur rôle de détoxification et de protection contre des contaminations aiguës.

La résistance acquise aux drogues est l'un des plus importants problèmes rencontrés dans la chimiothérapie des cancers. L'un des mécanismes proposés pour expliquer ce phénomène serait la séquestration de ces drogues ou de leur dérivées, tous des agents alkylants, par les MTs. Il a été démontré que les MTs pouvait aussi séquestrer de façon covalente les moutardes azotées (agents alkylants utilisés dans la thérapie d'un certain nombre de cancer et dérivés du gaz moutarde), dont le melphalan (Yu *et al.*, 1995) et le cyclophosphamide (Wei *et al.*, 1999). Par la suite, Bacolod *et al.* (2008) ont clairement démontré que la résistance de certaines cultures cellulaires vis-à-vis de la drogue alkylante BCNU (1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, ou carmustine, utilisée lors de thérapie anticancéreuse) est potentiellement due à des taux élevés de MTs. Ces dernières agiraient toujours en séquestrant les produits de dégradation de la drogue, les empêchant d'agir tel que

voulu. Ces résultats nous montrent avec évidence que la surexpression de MTs permet aux cellules de se débarrasser des formes actives de ces drogues. Toutes les recherches réalisées à ce sujet tendent à démontrer que les MTs peuvent donc fixer non seulement les métaux, mais aussi un grand nombre de produits d'alkylation et autres, comme par exemple de SBD-F lors de nos essais de dérivation (voir § 1.6.4)

Finalement, les MTs réagissent aussi avec l'anion superoxyde d'où leur rôle dans la protection contre le stress oxydatif. Les résultats des études de Ramana Kumari *et al.* (1998) démontrent que les isoformes de la MT (MT-I et MT-II) sont capables toutes deux de "nettoyer" les radicaux libres (4 types de radicaux libres ont été testés). Notamment, la MT-I est réagit de façon exemplaire avec l'ion superoxyde et les radicaux 1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl. Par exemple, lors de cette étude, 0.3mM de MT-I permettait de se débarrasser d'au moins 90% des ions superoxyde générés par le système hypoxanthine et xanthine oxydase. Les deux isoformes permettaient de se débarrasser totalement des radicaux hydroxyls générés par la réaction de Fenton.

1.2.2.3 Ubiquité

Les MTs sont omniprésentes dans le règne animal, autant chez les procaryotes que chez les eucaryotes, où elles sont impliquées dans la détoxification des métaux lourds et la protection des cellules contre les stress oxydatif (Klaassen *et al.*, 1999; Viarengo *et al.*, 1999). Le tableau **1.1** présente une sélection de travaux portant sur les MTs, les protéines de type métallothionéine (MTLPs) et autres protéines liant le Cd et montrant l'omniprésence de ce type de protéine à travers le règne animal (vertébrés et invertébrés).

Tableau 1.1. Ubiquité de la métallothionéine dans le règne animal (Vertébrés)

Sous- embranchement	Mode de vie	Taxon	Espèce	Références
Vertébrés	Terrestre	Mammifères	<i>Homo Sapiens</i> (Etre humain)	Hunziker et Kagi, 1985
			<i>Mus musculus</i> (souris)	Park et al., 2001
			<i>Rattus norvegicus</i> (rat)	Vasiles et Klassen, 1985
			<i>Oryctolagus cuniculus</i> (lapin)	Wan et al., 1993
		Oiseaux	<i>Melanitta spp</i> (canard)	Sejvarovic et al., 2002
			<i>Oceanodroma leucorhoa</i> (pétrel)	Elliott et al., 1992
			<i>Larus fuscus</i> (goéland brun)	Stewart et al., 1996
			<i>Calonectris diomedes</i> (puffin)	Stewart et al., 1996
	Aquatique	Poissons	<i>Sparus aurata</i> (dorade royale)	Ghadira et al., 2009
			<i>Soylorthinus torazame</i> (trouette)	Sun Cho et al., 2005
			<i>Percs fluviatilis</i> (perche)	Hogstrand et al., 1991
			<i>Oncorhynchus mykiss</i> (truite)	Hyllner et al., 1989
		Reptiles	<i>Pleurodeles waltl</i> (amphibien)	Mounaji et al., 2002
			<i>Cynops pyrogaster</i> (salamandre)	Suzuki et al., 1984
			<i>Chelonia mydas</i> (tortue)	Yamamura et Suzuki, 1984
			<i>Alligator mississippiensis</i>	Ball et Lopez, 1985

Tableau 1.1. (suite) (Invertébrés)

Sous- embranchement	Mode de vie	Taxon	Espèce	Références
Invertébrés	Terrestre	Nématodes	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Hughes et Sturzenbaum, 2007
		Gastropodes	<i>Helix pomatia</i> (es cangot)	Berger et al., 1995a
			<i>Arania arbustorum</i> (escargot)	Berger et al., 1995b
			<i>Eisenia foetida</i> (ver de compost)	Suzuki et al., 1980
		Annéliees	<i>Eisenia foetida</i> (ver de compost)	Yamamoto et al., 1991
			<i>Lumbricus terrestris</i> (ver de terre)	Furst et Nguyen, 1989
			<i>Lumbricus terrestris</i> (ver de terre)	Sturzenbaum et al., 1998
			<i>Lumbricus terrestris</i> (ver de terre)	Sturzenbaum et al., 2001
			<i>Lumbricus rubellus</i> (ver de terre)	Morgan et al., 2004
			<i>Eisenia andrei</i> (ver de compost)	Nesvadba et al., 2007
	Aquatique	Algues	<i>Fucus vesiculosus</i>	Morris et al., 1999b
		Mollusques	<i>Mytilus edulis</i> (moule)	McKay et al., 1999
			<i>Mytilus galloprovincialis</i> (moule)	El-Shezi et al., 2003
			<i>Crassostrea virginica</i> (huître)	Roesijadi et al., 1996
		Crustacés	<i>Carcinus maenas</i> (crabe)	Federer et al., 1998
			<i>Gammarus locusta</i> (langouste)	Cornelia et al., 2004

Les MTs peuvent être très différentes d'une espèce à l'autre, même si elles gardent les mêmes propriétés. De nombreuses études ont permis de séquencer le gène codant pour ces protéines chez plusieurs espèces. En particulier, la séquence d'acides aminés et l'ADNc des MTs ont ainsi été élucidés chez *E. foetida* (Gruber *et al.*, 2000), *Lumbriculus castaneus* et *L. terrestris* (Stürzenbaum *et al.*, 1998), et elles devraient partager des similarités avec celle de *E. andrei* (Ndayibagira *et al.*, 2007). La figure 1.7 présente les points communs et les différences entre les séquences d'acides aminés de la MT d'invertébrés (ver de terre *E. foetida*) et de vertébrés (rat *Rattus norvegicus*). En bref, nous pouvons observer que, malgré le fait que les deux protéines possèdent certains résidus cystéines en commun, les acides aminés constructifs sont très différents, sauf pour 3 acides aminés. Toutefois, les deux protéines possèdent toutes les deux environ 30% de cystéines et entre 60 et 70 acides aminés, ce qui laisse suggérer un rôle identique malgré leur différences constructives.

MT <i>Eisenia fetida</i>	
1 dt qccgkstc aregstccct ncrelksel pgckkl ccad aekgkcg nag ckcgaaackcs 61 agscaagckk gccgd	
1 mdpncscatd gscscagsck ckqcktsck kscscscpvg cackcsqg cic keasdkcscc 61	
MT <i>Rattus norvegicus</i>	

Figure 1.7. Comparaison entre les structure primaire des MTs d'invertébrés (ver de terre *E. foetida*) et de vertébrés (rat *Rattus norvegicus*), d'après Gruber *et al.*, 2000 et Robbins *et al.*, 1991.

De plus, il a été démontré par Gruber *et al.* (2000) que la MT de *E. foetida* est modifiée par l'organisme après translation en une MT autonome possédant un seul domaine (figure 1.8), contrairement à la MT des vertébrés qui est constituée d'un domaine α et d'un domaine β définis par l'enroulement hélicoïdal de la chaîne polypeptidique constituée de 62 résidus (figure 1.6, Robbins *et al.*, 1991).

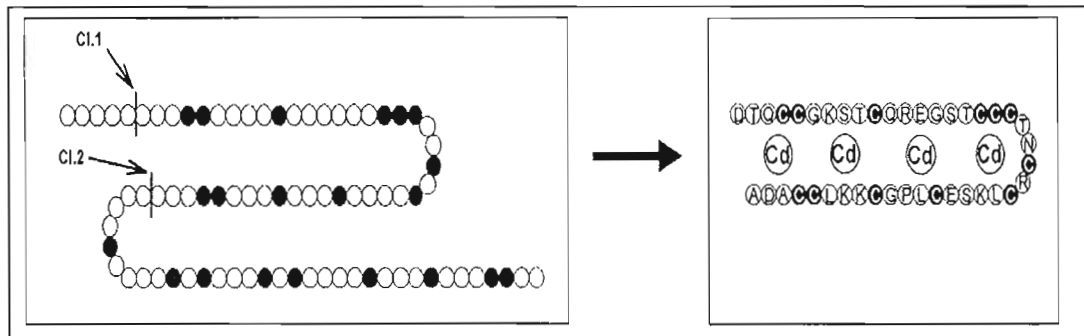


Figure 1.8. Clivage post-translation donnant une MT autonome de *E. foetida*, constituée d'un seul domaine liant 4 Cd^{2+} , tiré de Gruber *et al.*, 2000.

1.2.2.4 Induction

La synthèse de MTs peut être induite non seulement par les métaux (essentiels et non-essentiels), mais elle peut aussi être induite par une grande variété de facteurs endogènes et exogènes, naturels ou artificiels (e.g. Paraquat (pesticide/herbicide) et Benzo[a]Pyrene (BaP ; hydrocarbure aromatique polycyclique, produisant de ROs) (Coyle *et al.*, 2002; Ndayibagira *et al.* 2003, 2004, 2007). La synthèse de MT est induite par un grand nombre de cytokines et d'hormones de stress, mais aussi par un grand nombre de produits agissant indirectement dans la réponse au stress ou la réponse inflammatoire (Coyle *et al.*, 2002). De plus, les malformations congénitales et la baisse de la reproduction sont généralement associé avec un déficit de Zn et l'induction de MT maternelle provoqué par une grande variété de produits, *i.e.* l'arsenic, l'acide valproïque (médicaments antiépileptiques), l'éthanol, l'acide 2-ethylhexanoïque (solvant de pesticides et de peintures), le melphalan (agent chimiothérapeutique appartenant à la classe des agents alkylants type moutardes azotées) et l'uréthane (entrant dans la synthèse de matières plastiques, produits pharmaceutiques et pesticides) (Coyle *et al.*, 2002; Ndayibagira *et al.*, 2003). Certains composés répriment même la synthèse de MTs (*i.e.* Lindane (insecticide organochloré) et le Bisphénol A (monomère antioxydant pour la fabrication industrielle par polymérisation de plastiques et aussi

œstrogène-mimétique), tableau 1.2. Ndayibagira *et al.*, 2004). Le tableau 1.2 présente quelques uns de ces composés qui provoquent une réponse de l'expression de MTs (tiré de Ndayibagira *et al.*, 2004).

Tableau 1.2. Effets de quelques composés organiques sur l'accumulation ou l'induction de MTLPs (tiré de Ndayibagira *et al.*, 2004)

Composé	Effet	Espèces
Paraquat	↑	Souris
Lindane	↓	Palourde
Benzo(a)pyrène	↑	Bar
Méthylarsenate monosodique	↑	Poisson-chat
Rétinol	↑	Rat
Éthanol	↑	Rat
Morphine	↑	Rat
Bisphénol A	↓	Rat
Atrazine	↑	Homme

↑: induction/ accumulation/ up régulation des MTs

↓: inhibition/ métabolisme/ down régulation des MTs

L'expression du gène des MTs chez *E. andrei* en particulier est induite à divers degrés par toute une gamme de stimuli tels l'exposition aux métaux lourds, le stress oxydatif et les hormones. La réponse à ces inducteurs dépend du niveau de stress (Ndayibagira *et al.*, 2007). Les métaux sont particulièrement reconnus comme étant des inducteurs du stress oxydatif chez les animaux de laboratoires comme chez les espèces sauvages (Regoli *et al.*, 1998; Regoli, 2000; Frenzilli *et al.*, 2004), et donc de façon équivoque chez les vers de terre (Honsi *et al.*, 1999; Dhainaut et Scaps, 2001; Laszczyca *et al.*, 2004; Berthelot, 2008a). Il a été démontré qu'une préexposition au Cd (exposition à 200 µg Cd /L en aquarium pendant 7 jours suivi d'une période de repos de 28 jours) a permis la mise en place d'une résistance au stress oxydant chez des moules *Mytilus galloprovincialis* exposées par la suite au Fe (300-600 µg Fe /L en aquarium pendant 3 jours) (Viarengo *et al.*, 1999). En effet, les analyses biochimiques sur les tissus de la glande digestive ont démontré que le traitement Fe amène une augmentation significative de la production de radicaux libres chez les moules qui n'ont pas été exposées au Cd. Cette résistance au stress oxydant Cd-dépendante est liée à l'induction de MT, car le Cd n'a pas produit de

variation significative du glutathion réduit ni des enzymes antioxydantes majeurs. Les cellules isolées de glandes digestives de moules préexposées montrent une augmentation moindre des radicaux libres et une viabilité plus élevée après les traitements avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les analyses sur les organismes en entier montrent que la survie était diminuée chez les moules traitées avec le Fe, mais l'effet était moins prononcé dans les moules préexposées au Cd quand comparé avec celles qui ne l'étaient pas. Si ce rôle avait été suggéré au vue des résultants précédents, Andrew (2000) a pu démontrer que les métallothionéines pouvaient effectivement protéger les cellules des effets toxiques de certains métaux et de certains agents induisant un stress oxydatif. Lors de cette étude, les gènes de souris MT-I et -II ont été rapidement transcrit en réponse au Zn et au Cd, et tout autant en réponse à des agents causant un stress oxydant et/ou de l'inflammation. En effet, le H_2O_2 , la *tert*-Butylhydroquinone (tBHQ) et la ménadione ont chacun induit la MT-I de façon dose-dépendante dans les cellules Hepa de souris. Ces inductions de MTs étaient alors 4 à 20 fois supérieures au contrôle (Andrew, 2000). Par la suite, Kwang *et al.* (2008) ont observé que les niveaux d'expression d'ARNm de MT, cloné à partir de foie du poisson (*Paralichthys olivaceus*), était 5 fois plus élevés après 24h d'exposition à 10 $\mu g/L$ de BaP et 6 fois plus élevés après 6h d'exposition à 30 $\mu g/L$ de BaP. Ces résultats suggèrent fortement que la MT joue un rôle très important dans la détoxification des ROs causés par l'exposition au BaP. Ces chercheurs suggèrent même que la mesure d'ARNm de MT pourrait être un bon indicateur d'un stress oxydant subit par l'organisme. En conclusion, ces résultats suggèrent un rôle antioxydant de la MT, rôle qui semble être joué via la liaison/récupération des radicaux libres. La MT est donc capable de protéger du stress oxydant à la fois des cellules isolées et des organismes en entier (Viarengo *et al.*, 1999; Ramana-Kumari *et al.*, 1998).

Les MT peuvent être induites par des changements du statut reproductif, par la température, par le jeûne, par certaines drogues anticancéreuses ou par des agents hormonaux, mais l'induction des MTs par les métaux toxiques est bien plus intense/forte que l'induction par des stimuli non-métalliques (Van Cleef-Toedt *et al.*,

2000; Coyle *et al.*, 2002). En effet, des expositions à des concentrations élevées en Cd, Cu, Hg et Zn induit la synthèse de MTs les plus importantes (Van Beeks et Baars, 1988). Dans le cas d'expositions au Cd et au Hg, il a été démontré que ces métaux toxiques déplacent le Cu et le Zn physiologiques normalement associés aux MTs (Nielson *et al.*, 1985; figure 1.9). L'ion Zn déplacé se lie alors aux MTFs ("metallothionein transcription factor") grâce à la présence sur ces derniers de doigts "Zn". Les MTFs ainsi "activés" sont alors capables de se lier aux MREs ("metallothionein responsive element"), induisant l'expression du gène et la synthèse d'ARN messagers codant pour une protéine de type thionéine. Cette dernière se lie alors au surplus de métal exogène en formant une métalloprotéine (Roesijadi 1994a, 1994b; figure 1.9).

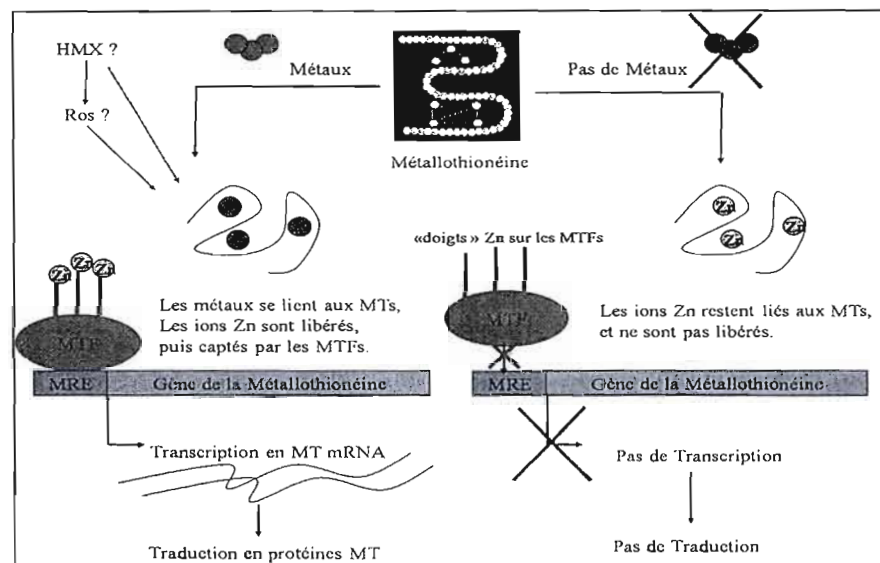


Figure 1.9. Mécanismes d'induction des MT et des MTFs, d'après Nielson *et al.*, 1985 et Roesijadi 1994a, 1994b.

Quant au HMX, on ne sait pas s'il est réellement capable de se lier aux MTs et de déplacer les métaux physiologiquement associés aux MTs, ou alors s'il produit des radicaux libres qui pourraient à leur tour déplacer le Zn physiologique et induire finalement l'expression de MTs.

Les MTs peuvent être induites dans un organisme suite à une injection ou une exposition aux métaux, en particulier au Cd ou au Cu (Furst et Nguyen, 1989; Roesijadi, 1994a; 1994b). Des concentrations sublétales en métaux toxiques tels que le Cd et le Cu induisent la production de MTs de façon dose-dépendante dans les tissus de bivalves *A. grandis* (Campbell *et al.*, 1990). L'induction des MTs est généralement spécifique au métal: pour chaque type de métal, il existe une isoforme particulière de MT qui pourra lier préférentiellement l'un ou l'autre des métaux lourds (Pedersen *et al.* 1998). Suzuki *et al.* (1980) ont observé trois protéines liant le Cd et de poids moléculaire différent chez le ver *E. foetida* maintenu dans un compost riche en Cd. Ces trois protéines détectées, liant le cadmium et de poids moléculaire différent, étaient en réalité un mélange de plusieurs isoprotéines. Le poids moléculaire de l'une de ces trois protéines a été estimé à environ 7000 Da, suggérant que cette protéine liant le cadmium est similaire à la MT si l'on prend en compte leurs propriétés chromatographiques communes. Ceci est ni plus ni moins la découverte de la MT chez le ver de compost *E. foetida/andrei* et le commencement de nombreuses recherches sur le sujet, de la caractérisation de la protéine, jusqu'à son rôle plausible en tant que biomarqueur. Une autre étude de Morgan *et al.* (2004) a démontré que le ver de terre *L. rubellus* possède deux isoformes fonctionnelles et différenciées de MTs, wMT-1 and wMT-2.

1.2.2.5 Localisation de la MT

Les organes comme les reins et le foie (impliqués dans les mécanismes d'emmagasiner et d'excréter), le tractus digestif et les poumons (organes situés à l'interface du milieu extérieur avec l'organisme) sont des organes où l'on retrouve de grandes quantités de métaux et, de ce fait, de grandes quantités de MTs (Waalkes et Klaassen, 1985; Klaassen, 1995). Toutefois, cette notion d'organes cibles est variable selon les espèces. En effet, les MTs ne s'expriment pas de la même façon et en même quantité dans les différents tissus du ver. On remarque leur présence dans le système digestif, mais également dans les organes génitaux du ver de terre

(Morgan *et al.*, 2004). Elles se localisent aussi préférentiellement dans le cytoplasme apical des cellules épithéliales de l'intestin, dans le tissu chloragogue (chloragocytes) qui séquestre les métaux à travers tout l'organisme (foie primitif), dans les néphridies (rein primitif) et dans les coelomocytes du système immunitaire (Morgan *et al.*, 2004 ; Homa *et al.*, 2005).

Le traitement des vers aux antibiotiques avant analyse a déjà été réalisé au sein du laboratoire d'Écotoxicologie Appliqué du CNRC-IRB afin de voir qui du ver ou de sa flore bactérienne était le plus impliqués dans la dégradation du TNT (données non publiées) mais les conséquences à court terme comme le stress ou la toxicité occasionnés par un tel traitement sont inconnues. On peut toutefois considérer que le terme ver de terre correspond tout au long de notre étude au système constitué par le ver lui-même et par sa flore microbienne; ou alors nous pouvons supposer que les quantités de MTLPs de la population bactérienne sont négligeables, si on considère que la purge est assez efficace pour se débarrasser d'un grand nombre de bactérie et *a fortiori* de leur MTLPs.

1.2.3 Méthodes de mesures

De nombreux protocoles et méthodes d'analyse ont été développés afin de doser directement ou indirectement les MTs dans les tissus de diverses espèces animales. Chacune des méthodes de mesures des MTs possède ses propres avantages et inconvénients. Toutefois et pour des raisons d'ordre pratique, la méthode utilisée lors de notre étude est celle décrite par Ndayibagira *et al.* (2007). Ce protocole a en effet été développé au sein du laboratoire du groupe d'Ecotoxicologie Appliqué et le matériel requis y est disponible. Avant de décrire cette méthode, voici un rapide survol des autres protocoles de mesures et méthodes d'analyse des MTs utilisés par d'autres laboratoires.

1.2.3.1 Essais immunologiques

Les méthodes ELISA et les essais radioimmunologiques permettent également de détecter les MTs dans les tissus (Chabicovsky *et al.*, 2003; Homa *et al.*, 2005). Ce sont des méthodes directes et sensibles, mais celles-ci sont utilisées le plus souvent pour la localisation et non pour la quantification. En effet, elles sont confrontées à la faible immunogénicité de la MT, au risque de polymérisation et à la perte des métaux liés, ce qui diminue fortement le potentiel de la méthode à des fins de quantification (Kruse-Jarres, 1989).

1.2.3.2 Détection colorimétrique

La détection colorimétrique des groupes thiols de la MT a été proposée par Viarengo *et al.* (1997). La méthode d'extraction, de purification et de dosage des thiols proposée dans cette étude a été élaborée pour éliminer les interférences causées par d'autres peptides soufrés de faible poids moléculaire comme la GSH et les résidus cystéines. Cette méthode de quantification est directe, sensible et rapide mais souffre d'un certain manque de spécificité, au même titre que la nôtre comme nous le verrons un peu plus loin.

1.2.3.3 Électrode au mercure

La méthode DPP (pour Differential Pulse Polarography) a été mise en place par Brdicka (1933) puis modifiée par la suite afin de permettre une mesure sensible et rapide des MTs (Olsson *et Haux*, 1986; Raspor *et al.*, 2001 ; Correia *et al.*, 2004). Elle consiste en la mesure de l'activité sulphydryl des protéines dans un extrait de tissu biologique dénaturé par la chaleur (Brdicka, 1933, Palacek *et Pechan*, 1970, Raspor *et al.*, 2001). La réponse de cette procédure est indépendante de la concentration en métal et met en place une électrode au mercure ou "hanging

mercury drop electrode" (HMDE). Un des gros avantages de cette méthode est qu'elle permet de mesurer à la fois la concentration en métal liés et la concentration en MTs (déduites de l'activité sulphydryl des protéines). Toutefois cette méthode possède aussi des inconvénients. En effet, la procédure est lourde à mettre en place : il y a de nombreuses étapes de purification et l'utilisation d'une électrode au mercure provoque la contamination des échantillons avec du Hg^{2+} : on devra alors se départir des échantillons dans le respect des normes environnementales. De plus, il est nécessaire d'avoir une très bonne connaissance des propriétés physicochimiques des MTs mesurées afin de pouvoir aisément analyser les résultats obtenus.

1.2.3.4 Saturation par les métaux

Comme les MTs ne possèdent pas de groupes fonctionnels spécifiques permettant une détection sensible et aisée (Kägi, 1991), les concentrations en MTs ont jusqu'à maintenant été déterminées par des méthodes indirectes basées sur la concentration des ions métalliques liés à la protéine. Parmi ces méthodes, les essais de saturation par des métaux radioactifs (Patierno *et al.*, 1983) ou non radioactifs (Onosaka et Cherian, 1981) sont le plus communément utilisés, notamment lors d'études environnementales chez les poissons (Klaverkamp *et al.*, 2000) et chez les organismes terrestres (Kammenga *et al.*, 2000; Svendsen *et al.*, 2002). Lors de ces essais, les concentrations de MTs sont mesurées en assumant une saturation totale des groupes SH par le métal utilisé (Gillis *et al.*, 2002; Dallinger *et al.*, 2004a). Toutefois, les résultats peuvent être influencés par la stabilité du complexe MT-métal formé et par l'interférence avec d'autres composés ou ligands biologiques ayant une certaine affinité pour le métal utilisé dans la méthode (Miyairi *et al.*, 1998). De plus, l'utilisation de radio-isotopes et les déchets de métaux lourds générés par ces méthodes posent un problème environnemental qu'il ne faut pas négliger. Toutefois, un avantage majeur d'une telle méthode est de pouvoir mesurer les ions métalliques liés aux MTs et de les discriminer (Campbell *et al.*, 1990). Ainsi, des méthodes

HPLC en combinaison avec des détecteurs de métaux tel que l' "Atomic Absorption Spectrometry" ou AAS (Lehman et Klaassen, 1986), l' "Inductively Coupled Plasma–Atomic Emission Spectrometry" ou ICP-AES (Suzuki, 1991), et l' "Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry" ou ICP-MS (Sunaga *et al.*, 1987) ont été développées. Guo *et al.* (1999) ont proposé de mesurer les quantités de MTs dans les tissus d'animaux par électrophorèse capillaire couplée à un spectromètre de masse avec ionisation par électro-nébulisation. Toutefois, ces méthodes indirectes nécessitent un équipement spécialisé et dispendieux.

1.2.3.5 Réaction de dérivation et HPLC

Parmi toutes les méthodes de quantification des MTs, la méthode HPLC, avec détection par fluorescence du complexe SBD-MT formé par l'alkylation des MTs par le fluorochrome SBD-F, semble être la plus prometteuse, en ceci qu'elle est pratique, sensible, versatile et offre une bonne résolution (Miyairi *et al.*, 1998). De surcroît, c'est une méthode de mesure directe (Richards, 1991). Un avantage certain de la méthode HPLC est la possible récupération de la fraction correspondant au pic de MTLPs afin de poursuivre les investigations : il sera alors possible de coupler l'HPLC avec un AAS, MS ou AES afin de mieux caractériser la ou les protéine(s) purifiée(s). Il sera tout aussi possible de réaliser une électrophorèse sur gel ou une purification en vue d'un séquençage des protéines ou d'une cristallographie afin d'obtenir les structures primaires et/ou secondaires. Toutefois, cette méthode nécessite un équipement spécialisé et dispendieux, surtout si l'on désire pousser plus avant les recherches tel que mentionné précédemment. En utilisant la méthode HPLC, Wan *et al.* (1993) ont quantifié avec succès les MTs dans les reins de lapin. El-Ghazi *et al.* (2003) ont par la suite réalisé une optimisation de la méthode de Miyairi *et al.* (1998). Cela a permis de discerner les différentes isoformes de MT présentes chez la moule de Méditerranée *Mytilus galloprovincialis* et ainsi faire la différence avec les MTLPs (El-Ghazi *et al.*, 2003). Plus récemment, Ndayibagira *et al.* (2007) ont développé au sein du laboratoire d'Ecotoxicologie Appliqué du CNRC-

IRB une méthode HPLC en phase inverse avec détection par fluorescence. Pour la détection des MTLPs dans les tissus de ver de terre. Cette méthode permet une détermination rapide et quantitative, mais peu spécifique des MTs et peut être facilement adaptable à d'autres types de tissus (*i.e.* invertébrés aquatiques). Dans ce cas-ci, on emploie généralement le terme anglais "MT-like proteins" (protéines simili-MT) ou MTLPs au lieu de MTs pour désigner les protéines quantifiées car la méthode possède une spécificité limitée. Précédée des étapes d'extraction et de purification associant chauffage, ultracentrifugation et filtration, cette méthode est adéquate pour l'étude d'induction des MTLPs et de leurs différentes propriétés, comme leur conservation et leur liaison aux métaux. Le pourcentage de récupération du complexe SBD-MT dans les extraits ainsi préparé est de 89.5% (Ndayibagira *et al.*, 2007). La réaction de dérivation permet la complexation sélective des MTLPs au SBD-F et la détection de ce complexe MTLP-SBD à 379nm (Ndayibagira *et al.*, 2007). La méthode HPLC en phase inverse offre une meilleure résolution ainsi qu'une meilleure sensibilité; de plus, on reconnaît généralement que l'élution par mode isocratique est préférable au mode gradient pour la détermination d'un composé spécifique (Miyairi *et al.*, 1998; Ait-Oukhtar *et al.*, 1996). Enfin, on estime que la détermination de la concentration de MTs dans les cellules est efficace avec des échantillons de plus de 10 000 cellules (Miyairi *et al.*, 1998). Suite à l'élution isocratique des MTLPs dérivées, Ndayibagira *et al.* (2007) ont analysé les fractions HPLC semi-purifiées de SBD-MTLP sur SDS-PAGE dans des conditions réductrices afin de déterminer le poids moléculaire des protéines mesurées. La résolution par électrophorèse sur gel de la fraction éluée à 7.2mn et correspondant au pic de MTLPs permet d'observer la présence de deux épaisses bandes de 6 kDa et 14 kDa. La première indique qu'il pourrait bien s'agir de MTs. Par contre, la bande à 14 kDa est encore énigmatique : il pourrait toutefois s'agir de dimères de SBD-MTLP (Ndayibagira *et al.*, 2007). Deux bandes représentant des protéines de taille équivalente (6 et 14 kDa) ont aussi été trouvées dans des homogénats de vers dénaturés et analysés avant la dérivation par le SBD-F (Ndayibagira *et al.*, 2007).

1.2.4 Biomarqueurs et exposition aux métaux/matériaux énergétiques

1.2.4.1 Définition du terme ``biomarqueur``

Un biomarqueur désigne tout indicateur biochimique présent dans un ou plusieurs organes d'un organisme comme réponse biologique à un contact avec un produit (Amiard et Amiard-Triquet, 2008). Le concept de biomarqueur est basé sur une mesure cellulaire et sur le principe que l'effet biologique d'un produit chimique toxique est initié par l'interaction de ce produit toxique avec un site récepteur chez un organisme vivant (Campbell *et al.*, 1990). Les effets d'une substance donnée au niveau de l'écosystème sont donc précédés par les réactions biochimiques de l'individu. De plus, les concentrations de contaminants nécessaires à initier ces réactions sont plus généralement plus faibles que celles requises pour constituer une menace pour la vie de l'organisme cible ou pour une dégradation perceptible de l'écosystème (Campbell *et al.*, 1990).

Le principe de l'utilisation d'un biomarqueur est de rechercher la signature biologique de l'impact (actuel ou passé) ou de la présence d'un xénobiotique dans l'organisme (biomarqueur d'exposition), ou de l'effet induit d'un changement ou stress environnemental (biomarqueur d'effet), et non la mise en évidence directe de la cause. Il peut s'agir de changements moléculaires, biochimiques, physiologiques histologiques et/ou morphologiques. Ce sont souvent des changements au niveau des enzymes, métabolites, ou d'autres types de molécules (histamine, hormone ou protéine (comme la MT) produites en réaction à une agression) (Amiard et Amiard-Triquet, 2008). Un biomarqueur est alors susceptible de permettre d'identifier la présence (on parlera alors de biomarqueur d'exposition, permettant de dire que l'organisme a été en contact avec le produit), l'effet (on parlera alors de biomarqueur d'effet, permettant de dire que le produit donnée possède des effets chez l'organisme) et/ou la mesure de phénomènes éco-physiologiques particuliers, tels que la toxicité ou l'impact d'une molécule, ou d'un cocktail de molécules (Amiard et Amiard-Triquet, 2008). A la différence de la bioindication qui est basée sur le suivi de la réponse d'une espèce par rapport à des caractéristiques du milieu (par exemple,

des changements démographiques au cours d'une pollution), le biomarqueur est donc une réponse mesurée "à un niveau inférieur à celui de l'individu" (Amiard et Amiard-Triquet, 2008). Le potentiel des biomarqueurs pour l'écotoxicologie et la surveillance de l'environnement a été souligné par Peakall (1994). Par la suite, les chercheurs ont travaillé sur l'identification et le développement de biomarqueurs potentiels chez les espèces pertinentes pour les essais toxicologiques, comme les invertébrés terrestres et les vers de terre (Kammenga *et al.*, 2000; Scott-Fordsmand et Weeks, 2000; Svendsen *et al.*, 2002) ou les invertébrés aquatiques (Gagné *et al.*, 2005b).

1.2.4.2 Utilisation des biomarqueurs dans les études écosystémiques

Le rôle des biomarqueurs est de révéler un état biologique ou physiologique, de manière simplifiée et sûre, afin notamment de poser ou confirmer un diagnostic et/ou un pronostic. Plusieurs biomarqueurs différents peuvent être utilisés pour rendre des résultats plus sûrs et fiables (on parle alors d'une batterie de biomarqueurs). Les biomarqueurs peuvent aussi révéler un événement (contact avec un produit toxique) passé car certains produits sont bioaccumulés par les organismes (Amiard et Amiard-Triquet, 2008).

L'utilisation de biomarqueurs en écotoxicologie est d'un grand intérêt puisqu'elle offre l'avantage de procurer un outil sensible et intègre une variété de facteurs environnementaux et écologiques qui contrôlent et modulent l'exposition aux contaminants (Lagadic *et al.*, 1997; 1998). Cependant, la multitude de ces facteurs rendent difficile l'interprétation des réponses observées (Arnaud *et al.*, 2000). En effet, plusieurs facteurs peuvent influencer la réponse des biomarqueurs. La santé générale de l'organisme, l'âge, la taille, le statut nutritionnel, le stade de reproduction et de développement, la densité de la population, la saison, la température ambiante, les manipulations et le substrat sont tous susceptibles d'exercer un effet (Arnaud *et al.*, 2000; Svendsen *et al.*, 2002; Gillis *et al.*, 2004). Le

risque inhérent à l'utilisation des biomarqueurs est donc la possibilité d'une mauvaise interprétation des réponses (Arnaud *et al.*, 2000; Svendsen *et al.*, 2002). Afin d'éviter ce danger et pour l'application en bonne et due forme des biomarqueurs, certaines informations sont requises (Svendsen *et al.*, 2002) : 1) la relation de dose-réponse doit être connue; 2) le temps requis pour que l'effet se manifeste doit être atteint et ce dernier doit persister pendant et après l'exposition; 3) la variabilité de la réponse du biomarqueur vis-à-vis le contaminant est plus importante que la variabilité spatiale, interindividuelle et temporelle; 4) la spécificité du biomarqueur doit être connue; 5) la variabilité inhérente à la mesure biologique due aux saisons, à la température, au pH, au sexe, au poids et à la manipulation doit se situer dans un intervalle qui ne doit pas interférer avec l'interprétation des effets toxiques; 6) des liens doivent exister entre la signification biologique de la réponse mesurée et des effets perçus à de plus hauts niveaux organisationnels; 7) la méthodologie employée doit être précise, reproductible et devrait être facile à utiliser. Aucun biomarqueur n'a encore été validé en tant qu'outil unique servant à la détection des polluants (Lagadic *et al.*, 1997; 1998). Une meilleure appréciation de toutes ces variables et un plus large éventail de biomarqueurs pourraient donc mener à de bons outils permettant l'évaluation de sites contaminés.

Le principe est en théorie très séduisant et moins coûteux que d'autres suivis, mais pour être certain qu'un biomarqueur soit spécifique, il faut souvent de longues études, et une compréhension complète du mécanisme qui est à l'origine du biomarqueur. Par exemple, la mesure des MTs chez certains invertébrés (du sol comme *E. andrei* ou aquatique comme *Lumbriculus variegatus* ou même *Elliptio complanata*) a été proposée comme biomarqueur de la présence de certains polluants (Cd et autres métaux) dans les environnements terrestre et aquatique de certains sites militaires canadiens et américains (Ndayibagira *et al.*, 2007 ; Bérubé *et al.*, 2006, 2007). Ces zones contaminées pourraient ainsi être suivies ponctuellement (pour vérifier si une pollution accidentelle a eu des impacts par exemple) ou en utilisant ces invertébrés comme *sentinelles* à long terme (analyse en routine). Ceci nécessite cependant préalablement d'avoir vérifié que le biomarqueur est bien

spécifique de ces polluants et de connaître son expression chez des invertébrés en bonne santé, toute l'année, dans un environnement pas ou peu pollué par ces produits (Amiard et Amiard-Triquet, 2008). Des chercheurs visent le développement de biopuces à ADN (ou à anticorps) capables de détecter des toxiques, des pathogènes ou un effet toxique ou une pathologie (Amiard et Amiard-Triquet, 2008).

1.2.4.3 Les Métallothionéines comme biomarqueurs

Une grande part de l'intérêt pour les biomarqueurs est tournée vers les protéines liant les métaux, en particulier sur les MTs et les MTLPS (Campbell *et al.*, 1990). Étant donné les propriétés moléculaires des MTs ou MTLPS et nos connaissances actuelles sur leur rôle dans la captation des métaux, leur transport, leur emmagasinage et leur élimination, elles peuvent être utilisées dans les écosystèmes aquatiques et terrestres comme un biomarqueur spécifique d'un stress ou d'une exposition aux métaux (Campbell *et al.*, 1990). En effet, certaines études proposent la mesure des concentrations de MTs ou des taux d'ARN de MTs chez les invertébrés comme biomarqueur d'une contamination aux métaux lourds (Roesijadi *et al.*, 1994a; Galay-Burgos *et al.*, 2003; Dallinger *et al.*, 2004b; Ndayibagira *et al.*, 2007). La mesure directe de la concentration de MTs dans un tissu peut être un indicateur précoce si l'on assume que les niveaux constitutifs de MTs sont bas et que toute augmentation des concentrations au dessus de ces niveaux basaux est attribuable à une induction de la MT en réponse à un influx de métaux toxiques provenant du milieu extérieur (Campbell *et al.*, 1990). Et naturellement, la méthode développée dans l'étude de Ndayibagira *et al.* (2007) apparaît être rapide, sensible et adéquate afin de mesurer directement les MTLPS totales dans les tissus de vers de terre. Les résultats présentés lors de cette étude suggèrent que la mesure des MTLPS dans les espèces de ver de terre sentinelles pourraient apporter des informations sur la biodisponibilité du Cd dans les sols. Ainsi, cette méthode pourrait être un outil précieux pour la surveillance ecotoxicologique de la contamination des sols par le Cd. Comme les vers de terre ont un rôle central dans la qualité et la

fertilité des sols, toute agression toxique vis-à-vis la population de vers représente une menace potentielle au reste de l'écosystème (Ndayibagira *et al.*, 2007).

La présente étude se veut un dépistage préliminaire des effets sur les MTLPs suite à une exposition en sol au HMX, Cd et Pb afin de déterminer le potentiel de cette protéine comme biomarqueur. Les MTs offrent déjà une certaine utilité pour l'évaluation de la qualité de l'environnement et la surveillance des métaux dans les écosystèmes aquatiques et terrestres. Ainsi, elles ont fait l'objet d'études sur les poissons (Olsson et Haux, 1986; Brown *et al.*, 1987; Urena *et al.*, 2007), les crustacés (Perdersen *et al.*, 1998) et les invertébrés aquatiques (Couillard *et al.*, 1993; Perceval *et al.*, 2002; Gillis *et al.*, 2002, 2004; Dragun *et al.*, 2004) ou sur les mammifères (Burger *et al.*, 2000), les reptiles (Trinchella *et al.*, 2006), et les invertébrés terrestres (Chabicoovsky *et al.*, 2003; Dallinger *et al.*, 1996 à 2004c; Demuynck *et al.*, 2006). Dorénavant, la mesure des quantités de MT, de MTLPs ou de MTmRNA (ARN messenger codant pour la MT) sont utilisées avec une batterie de biomarqueurs chez des organismes aquatiques (Astley *et al.*, 1999; Blaise *et al.*, 2002; Gagné *et al.*, 2002; 2005a; Perceval *et al.*, 2002) et terrestres (Lukkari *et al.*, 2004; Dallinger *et al.*, 2004a; 2004b).

1.2.4.4. Un outil statistique très utile : L'ACP

L'analyse en composantes principales a été inventée en 1901 par Karl Pearson et est principalement une transformation spatiale vectorielle utilisée pour réduire de grand set de données en une structure plus facile à analyser (Pearson 1901). L'ACP permet de lier les variables standardisées avec des composantes statistiques (Lebart *et al.*, 2001). Elle est souvent utilisée pour identifier les variables sous-jacentes (composantes) qui peuvent expliquer les intercorrélations entre les variables observées (Galay-Burgos *et al.* 2005). En théorie, chaque variable est positionnée dans un espace tridimensionnel dans lequel les trois axes représentent les composantes principales. De plus, ces composantes principales peuvent

expliquer un certain pourcentage de la variance au sein des données et la contribution de chaque composante à la variance totale peut en être facilement déduite (Lebart *et al.*, 2001). Les résultats d'une ACP sont habituellement discutés en termes de score par rapport à une composante ou même de charge (liaison) à une ou plusieurs composantes (Shaw, 2003). Grâce au critère de Kaiser-Guttman, l'essentiel de l'information peut être réduite en pratique à deux ou trois composantes principales, ce qui fournit à l'utilisateur une représentation graphique simple en 2 ou 3 dimensions permettant d'enquêter aisément sur les relations potentielles entre toutes les variables (Lebart *et al.*, 2001; Galay-Burgos *et al.* 2005). Finalement, si l'ACP est majoritairement utilisée pour visualiser des données, il ne faut pas oublier que c'est aussi un moyen de corrélérer ces données et de "débruiter" ces données, en considérant que les axes que l'on décide d'oublier sont des axes bruités.

Astley *et al.* (1999) ont réalisé une analyse multivariée des réponses de certains biomarqueurs chez les bivalves et les crabes afin de caractériser leurs liens avec l'exposition au Cd. De même, Perceval *et al.* (2002) ont établi des relations entre les caractéristiques physiques et chimiques de certains lacs québécois et les réponses de biomarqueurs du bivalve *P. grandis*. Galay-Burgos *et al.* (2005) ont appliqué l'analyse statistique multivariée aux résultats obtenus à la suite d'une exposition au Cu et au Cd sur certains biomarqueurs (dont la MT) et sur les EREs dans le but d'enquêter sur les effets de ces métaux chez le vers *Lumbricus rubellus*. L'outil PCA a aussi été utilisé par Burger *et al.* (2000) afin de montrer que la mesure des concentrations en métaux et en métallothionéine dans le foie de raton-laveurs peut être utile d'un point de vue environnemental. L'analyse en composantes principales est dorénavant utilisée comme outil dans l'analyse de données exploratoires et pour réaliser des modèles prédictifs.

1.3 Les agents toxiques à l'étude

1.3.1 La question environnementale des UXOs

Les UXOs (UneXploded Ordnances ; figure 1.10) sont des munitions qui n'ont pas explosé lors de leur utilisation et qui se retrouvent dans les sols et les sédiments. Ces objets posent toujours un risque de détonation ou de contamination et engendrent une préoccupation environnementale mondiale particulièrement dans les anciennes zones de combats en Irak, en France ou en Allemagne ainsi que dans les zones d'entraînement militaire comme les bases militaires canadiennes de Valcartier, Gagetown et Wainwright (Ampleman *et al.*, 1998 à 2004; Marois *et al.*, 2004; Robidoux *et al.*, 2000a à 2008; Thiboutot *et al.*, 1998, 2004). Ces bombes, grenades et mines demeurent toujours sensibles, hautement explosives et donc dangereuses. Pour cette raison, lorsqu'on en découvre, elles doivent être manipulées avec soin par un personnel hautement qualifié (professionnels EOD (pour Explosive Ordnances Disposal)).



Figure 1.10. UXO de la base militaire de
Wainwright, Alberta, Canada
www.wainwright.army.mil

Pour la plupart, ce sont des munitions d'artillerie corrodées contenant des agents explosifs et/ou propulseurs. Selon l'Agence de Protection de l'Environnement américaine (USEPA) dans une déclaration en 2002, les UXOs se retrouvent dans environ 16,000 terrains militaires inactifs à travers les USA et posent un risque de santé publique "imminent et substantiel" ; ils pourraient nécessiter le plus grand programme de nettoyage environnemental jamais réalisé, soit un coût avoisinant les 14 milliards de dollars US.

En plus du risque de santé publique, les UXOs enfouis posent un risque de contamination environnementale dans les zones militaires les plus fréquentées. Ainsi, les produits chimiques comme les explosifs contenus dans les munitions corrodées et les métaux qui les composent peuvent entrer dans les sols, les sédiments de rivières et les nappes phréatiques et contaminer les espèces animales du bas de la chaîne alimentaire (insectes, vers, poissons) autant que ceux du haut (rapaces, poissons carnivores, mammifères et humains). Aux États-Unis et au Canada, le SERDP ("Strategic Environmental Research and Development Program") subventionne de façon massive la recherche dans la détection et les effets des UXOs.

En plus des UXOs, il faut aussi prendre en compte la pollution occasionnée par les détonations totales ou partielles des munitions. Puisque les UXOs posent un problème environnemental, il en va de même pour les munitions ayant subi une détonation partielle. Dans ce cas, on retrouvera dans l'environnement des débris métalliques et des morceaux d'explosifs non dégradés au moment de l'explosion. Quant aux détonations totales, elles produisent de grandes quantités de débris métalliques provenant de l'obus et de la cible. Également, sur le terrain d'entraînement, il peut y avoir une contamination au niveau des carcasses de véhicules et des buttes de terre qui servent de cibles, mais aussi au niveau des positions de tir où les nuages de poudre de métaux et d'explosifs provenant de la bouche des canons retombent au sol. Les endroits servant à l'élimination par détonation des UXOs récupérés peuvent aussi être contaminés.

1.3.2 Un composé polynitro-organique : le HMX

1.3.2.1 Considérations générales

Le HMX (aussi octahydro-1,3,5,7-tétranitro-1,3,5,7-tétrazocine) est un contaminant polynitro-organique (PNOs) (figure 1.11) et explosif qui se retrouve dans les UXOs. Il se présente généralement sous forme de cristaux blanc et bleu. Le HMX possède des propriétés explosives 130 % supérieures à celles du TNT dues à son plus haut point de déflagration et à sa vitesse de détonation de 9100 m/s. Sa solubilité dans l'eau est par contre faible (6,6 mg/L à 20°C), ce qui implique que son lessivage dans les eaux souterraines est limité (McLellan *et al.*, 1988; Talmage *et al.*, 1999). Une dégradation photochimique est possible dans les eaux de surface, mais elle se produit lentement (Talmage *et al.*, 1999).

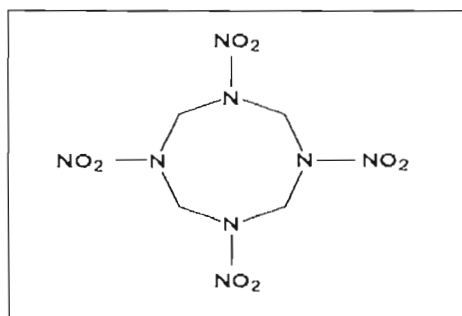


Figure 1.11. Structure chimique du HMX

1.3.2.2 Recommandations pour la qualité de l'environnement

D'après les travaux préliminaires de Robidoux *et al.* (2006), les RQSEM_E (Recommandations de la qualité des sols d'entraînement militaires, en fonction de l'environnement ou écologiques), RQSEM_{VA} (Recommandations de la qualité des sols d'entraînement militaires, en fonction de la vie aquatique) et l'Eco-SSL (Eco-SSL ou niveaux écologiques de dépistage des sols) pour le HMX ont été respectivement établis à 32, 13 et 29 mg/kg de sol (masse sèche) (Tableau 1.3 et 1.4).

Tableau 1.3. Recommandations préliminaires de la qualité des sols en fonction de la santé humaine et des fonctions écologiques pour les sites d'entraînement militaire (tiré de Robidoux *et al.*, 2006).

Composé	Santé humaine			Fonctions écologiques		
	RQSEM _{SH} ^{1,2}	RQSEM _{ES} ^{1,2}	CPES ^{3,4}	RQSEM _E ²	RQSEM _{VA} ²	RQE ^{4,5}
TNT	41	0.15	0.0047	3.7	31	0.12 ⁶
RDX	250	0.24	0.028	4.7	7.6	0.19 ⁷
HMX	4100	3.4	0.093	32	13	0.33 ⁷
2,4 DNT	0.14	0.01	0.0007	11	130	0.91 ⁶
2,6 DNT	0.14	0.01	0.0007	8.5	130	0.93 ⁶
NG	2500	7.8	0.28	65	2.4	0.01

¹ Basées sur les effets avec seuil, excepté pour le 2,4- et la 2,6-DNT (risque de cancer de 10⁻⁵).

² En mg/kg de sol (masse sèche).

³ Critères préliminaires pour l'eau souterraine de type CCME

⁴ En mg/L.

⁵ Valeurs applicables pour les eaux de surface en cas de résurgence de l'eau souterraine.

⁶ Valeur du MDDEP (2006).

⁷ Valeurs tirées de Talmage *et al.* (1999) pour l'eau de surface.

Tableau 1.4. "Ecological Soil Screening Levels" (Niveaux écologiques de dépistage du sol) préliminaires de l'USEPA pour les matériaux énergétiques (ME), en mg/kg sol (poids sec) (tiré de Robidoux *et al.*, 2006)

Composé	Plantes	Invertébrés	Mammifères
TNT	12	59	3.2
RDX	-	85	2.9
HMX	-	29	50
2,4-DNT	5.7	19	238
2,6-DNT	2.6	8.1	351
NG	-	-	79

Les "Ecological Soil Screening Level" sont des critères génériques pour les sols développés pour l'USEPA. Ce sont exclusivement des valeurs-guide préliminaires de dépistage permettant un premier diagnostic des sites pollués. Ils sont propres à chaque polluant et ont notamment été établis de façon préliminaire pour les explosifs, HMX compris (Tableau 1.4). Les valeurs présentées sont des concentrations dans le sol censées être sans effets néfastes. Les Eco-SSL

permettent en effet d'estimer les concentrations admissibles en contaminants pour les récepteurs écologiques qui sont en contact direct avec le sol ou qui ingèrent un organisme vivant dans ou sur le sol.

Toutefois, ces valeurs (RQSEM_E, RQSEM_{VA} et Eco-SSL) pourraient s'avérer trop conservatrices pour les secteurs d'entraînement militaire. Lors de leur détermination, on suppose que les espèces de la faune passent toute leur vie sur les zones contaminées et mangent exclusivement de la nourriture contaminée. Ce point est encore plus discutable puisque la contamination par les ME sur les terrains des Forces Armées Canadiennes est hétérogène et consiste en des "points chauds" autour des cibles et des points de destruction des UXOs. Il est hautement improbable qu'un animal vive continuellement sur ces "points chauds" contaminés. Pour cette raison, les précédents critères (RQSEM_E et RQSEM_{VA}; Robidoux *et al.*, 2006) ont été révisés en 2008 et leurs noms ont été changés, afin de mieux les caractériser. La plus récente valeur est de 89 mg/kg pour les invertébrés et les plantes, et ce critère a été appelé "concentration dans le sol pour l'entraînement militaire durable" (CSEMD) (tableau 1.5 ; Lachance *et al.*, 2008).

Tableau 1.5. Les Concentrations environnementales dans les Sols pour un Entraînement Militaire Durable (CSEMD), en mg/kg sol (poids sec)

Composé	Microbes	Invertébrés et plantes	Autres animaux	CSEMD _E
TNT	9.6	42	102	9.6
RDX	-	167	10.8	10.8
HMX	-	89	139	89
2,4 DNT	-	11	18	11
2,6 DNT	-	10.6	45	10.6
Nitroglycérine (NG)	-	92	36	36

1.3.2.3 Concentrations dans les sols de type militaire

Au Canada, notamment au Cold Lake Air Weapon Range (CLAWR), en Alberta, la concentration en explosif dans le sol du champ de tir Shaver River (Shaver River Range) variait entre 0,31 à 3,98 mg HMX/kg de sol sec (Tableau 1.6, Ampleman *et al.*, 2004), ce qui représente de concentrations inquiétantes mais n'affectant pas encore la qualité du sol de ce site militaire (Tableaux 1.3 à 1.5).

A la base des Forces Canadiennes de Gagetown (Gagetown CFB) au Nouveau-Brunswick, le contenu en explosif des échantillons de sols collectés autour des cibles du champ de tir antichar de Wellington se situait entre 17,1 et 1040 mg HMX/kg sol sec. Les échantillons de sol collectés près des zones de démolition des charges antitank contenaient, après la détonation d'un UXO, de 29,6 à 161 mg HMX/kg sol sec (Tableau 1.6, Thiboutot *et al.*, 2004).

A la base des Forces Canadiennes de Valcartier (Valcartier CFB) située au Québec, les échantillons de sols collectés sur le champ de tir de Liri présentaient de 1,4 mg HMX/kg sol sec (minimum observé le plus loin des cibles) à 465 mg HMX/kg sol sec (maximum observé le plus près des cibles) (Marois *et al.*, 2004).

Les valeurs pour les bases du Nouveau-Brunswick et du Québec dépassent de façon inquiétante les recommandations préliminaires établies par les gouvernements canadien et américain (Tableau 1.3 à 1.5).

Tableau 1.6. Concentrations en HMX les plus importantes retrouvées dans les sol de RTA au Canada.

BASE	SITE	OCCUPATION	Concentration en HMX		Références
			Min ¹	Max ¹	
Gagetown, N.B.	Wellington	Périmètre antichar	ND	1290	Thiboutot <i>et al.</i> , 2004 Robidoux <i>et al.</i> , 2006
		Cibles	17.1	1040	
		Positions de tir	ND	11.2	
	Hersey, Lawfield et Greenfield	Zone d'impact de l'artillerie	ND	1.1	
	Old and New Castle	Secteur de tir a la grenade	ND	0.03	
	Argus	Zone d'impact HE	ND	8.9	
	EOD bunks	Avant détonation	0.31	0.51	
		Après détonation	29.6	161	
Wainwright, Alberta	-	Périmètre antichar	ND	3700	Thiboutot <i>et al.</i> , 1998 Robidoux <i>et al.</i> , 2006
CLAWR, Alberta	Shaver River	Champ de tir	0.31	3.98	Ampleman <i>et al.</i> , 2004
Valcartier, Québec	Liri	Cibles	1.4	465	Marois <i>et al.</i> , 2004; Robidoux <i>et al.</i> , 2006
	Termoli	Buttes d'impact	0.07	0.58	
	-	Périmètre antichar	ND	3900	
Dundurn, Saskatchewan	Secteur 2	Périmètre antichar	ND	120	Ampleman <i>et al.</i> , 1998 Robidoux <i>et al.</i> , 2006
	Secteur Cougar	Périmètre antichar	ND	21	
Shilo, Manitoba	-	Tir a la grenade	ND	0.2	Ampleman <i>et al.</i> , 2003 Robidoux <i>et al.</i> , 2006
Chilliwack, B.C.	Secteur Slesse	Tranchées en béton	ND	0.3	Ampleman <i>et al.</i> , 2000 Robidoux <i>et al.</i> , 2006
	Secteur Vokes	Zone de détonation	ND	0.53	
	Secteur Soowhalie	Périmètre antichar	ND	5.89	
		Secteur de tir a la grenade	ND	1.16	

¹ : en mg/kg sol sec

ND : Non détecté

- : inconnu

1.3.2.4 Effets biologiques du HMX

Les hauts niveaux de ce contaminant dans les sols et les sédiments des sites militaires ainsi que les propriétés récalcitrantes de cet explosif ont conduit à de nombreuses études et publications (Simini *et al.*, 2004a, 2004b; Robidoux *et al.*, 2000 à 2006; Sunahara *et al.*, 2009). Des études récentes sur les écosystèmes terrestres ont montré que le HMX ne diminue toutefois pas la croissance des plantes à des concentrations élevées : jusqu'à 1866 mg/kg sol sec (sol artificiel), 3320 mg/kg sol sec (sol naturel forestier) (Robidoux *et al.*, 2003) et même <10000 mg/kg sol sec (sol SSL âgé) (Rocheleau *et al.*, 2005). De plus, le HMX n'a pas affecté la survie des adultes de deux espèces d'enchytrides (vers blancs *Enchytraeus albidus* et *Enchytraeus crypticus*) à la plus haute concentration testée (918 mg/kg d.w.). La production de juvéniles (reproduction) de ces deux espèces n'a pas été altérée par le HMX, et ce, à toutes concentrations testées (Dodard *et al.*, 2005). Les résultats présentés par cette étude sont cohérent avec ceux rapporté par Kuperman *et al.* (2004). Cette seconde étude mentionnait alors n'avoir observé aucun effet adverse du HMX sur le ver blanc *E. crypticus* dans un sol fraîchement amendé, et ce jusqu'à la plus haute concentration testée, soit 21,750 mg/kg. Aussi, le HMX n'a eu aucun effet significatif sur la survie et la croissance du polychète marin *Neanthes arenaceodentata* (ver) et de l'amphipode estuaire *Leptocheirus plumulosus*, et ce pour des concentrations aussi hautes que 1000 mg/g sédiments (poids sec) (Lotufo *et al.*, 2001). La reproduction, mesurée seulement chez l'espèce *L. Plumulosus*, n'a pas été non plus affecté de façon significative après des expositions de 10 et 20 jours à des sédiments amendés. Aucun effet sublétaux n'ont été observés lors de cette étude (Lotufo *et al.*, 2001). La survie de la larve du moucheron *Chironomus tentans* et de l'amphipode *Hyaella azteca* n'ont pas été affecté après une exposition à la plus haute concentration de HMX testée (400 mg/kg) (Steevens *et al.*, 2001). Il a été observé lors d'études antérieurs que le HMX a un petit effet sur la survie ou d'autres paramètres toxicologiques comme la croissance et la reproduction. Bentley *et al.* (1977) ont démontré que le HMX n'était pas toxique pour les espèces *D. magna*, *Gammarus fasciatus* (amphipode), *Asellus militaris* et *C. tentans* jusqu'à 32

mg/L dans les études de toxicité aigue et jusqu'à 3.9 mg/L dans les études de toxicité chronique. Les résultats de cette étude indiquent que le HMX est relativement non toxique pour les invertébrés aquatiques pour des concentrations approchant sa solubilité dans l'eau (2.6 mg/L à 20 °C, Spangord, 1980) et pour des concentrations typiquement rencontrés dans les sédiments de terrains contaminés. De façon similaire, des sols amendés avec du HMX n'ont pas eu d'effets significatifs sur la survie des vers de terre, pour une concentration aussi haute que 500mg/kg (sol sec) (Pennington, *et al.* 1999; Phillips, *et al.* 1993) et 3013 mg/kg (sol sec) (Robidoux *et al.*, 2001). Aucun effet sur la survie des enchytrides et des collembolés n'ont été observé, et ce pour des concentrations aussi hautes que 1000mg/g (sol sec) (Schafer et Achazi, 1999). Des solutions saturées de HMX n'ont eu aucun effet significatif sur la survie d'un grand nombre d'invertébrés aquatiques (Bentley *et al.*, 1984).

À l'opposée, la croissance et la reproduction des vers de terre ont été sévèrement affectées dans des sols amendés pour des concentrations aussi basses que 25mg/kg, suggérant que de grandes différences de sensibilité entre les espèces peuvent exister pour ce composé (Pennington, *et al.* 1999). Phillips *et al.* (1993) ont toutefois démontré que les sols associés au HMX ne sont pas létaux pour le ver de terre. Ce dernier point a été confirmé par les études plus récentes (Robidoux *et al.*, 2000b, 2001, 2002; Savard *et al.*, 2005, 2007) (Table 1.7). Mais il a été clairement démontré que le HMX affecte la biomasse provoquant ainsi des pertes de poids et diminuant la croissance et la reproduction du ver de terre *E. andrei* (Robidoux *et al.*, 2001, 2002). Le HMX exerce donc une toxicité chronique plutôt qu'aiguë chez *E. andrei*. Le paramètre « croissance » est considéré comme un paramètre simple et pertinent d'un point de vue écologique (USEPA, 2003, 2005) servant à mesurer les effets d'un produit toxique sur la capacité d'un ver de terre à devenir mature et à emmagasiner des réserves. Et effectivement, le HMX induit des pertes de poids de façon dose-dépendante, et ce, après seulement 14 jours d'exposition (Phillips *et al.*, 1993; Robidoux *et al.*, 2001, 2002; Berthelot *et al.*, 2008a). Toutefois, le paramètre « reproduction » est un paramètre beaucoup plus

sensible et toujours pertinent d'un point de vue écologique (USEPA, 2003, 2005); il est utilisé afin de mesurer les effets d'un produit toxique sur la capacité d'un ver de terre à procréer et maintenir une population stable à long terme. Le HMX diminue de façon dose-dépendante la plupart des paramètres de reproduction (Table 1.7). De façon générale, c'est le nombre de juvéniles qui est le paramètre le plus sensible (Tableau 1.7). Les valeurs pertinentes et présentées lors de ces études dans différents types de sols, comme les CL_{50} / CE_{50} et les CSEO pour les paramètres les plus importants et les plus significatifs (voir lexique), ont été rassemblés dans le tableau 1.7 sous trois grandes rubriques : la létalité du produit (toxicité aiguë), la diminution du nombre de cocons et celle du nombre de juvéniles (paramètres de reproduction, toxicité chronique).

De plus, les études de Robidoux *et al.* (2001, 2002) et de Kuperman *et al.* (2007) ont aussi démontré une différence de toxicité du HMX entre un sol sablonneux (Tableau 1.7, CE_{50} après 56 jours de 2,7 mg HMX/kg sol sec pour la production de cocons), un sol de type forestier (CE_{50} après 56 jours de 11,3mg HMX/kg sol sec) et un sol artificiel (CE_{50} après 56 jours 64 mg HMX/kg sol sec). Une telle différence pourrait être expliquée par les caractéristiques physiques et chimiques du sol : 1) une grande quantité de sable permettrait un plus important volume d'eau interstitielle dans les sols sablonneux et de type forestier et 2) le taux de matière organique plus important dans le sol artificiel (10%) que dans les sols de type forestier (3,8%) ou sablonneux (1,2%) favoriserait une plus grande liaison du contaminant, l'empêchant ainsi d'être biodisponible pour les vers de terre (Berthelot *et al.*, 2008a). De plus, les études de Simini *et al.* (2004a, 2004b) ont démontré une différence de toxicité du HMX entre un sol fraîchement amendé (CSEO après 56 jours de 6,5 mg HMX/kg sol sec pour la production de cocons) et un sol amendé puis vieilli (CE_{50} après 56 jours de 562 mg HMX/kg sol sec).

Toutefois, les études sur la toxicité du HMX chez les espèces supérieures manquent à l'appel.

Tableau 1.7. Toxicité aiguë (léthalité) et chronique (nombre de cocons et de juvéniles) du HMX chez *Eisenia sp.* dans différents type de sols.

Type de sol	Temps d'exposition (j)	CL ₅₀ /CE ₅₀ (mg/ml)	CSEO (mg/ml)	CME0 (mg/ml)	Références
Toxicité aiguë – Létalité					
Artificiel	14	> 500	500	> 500	(Philips <i>et al.</i> , 1993)
Artificiel	14	> 2503	2503	> 2503	(Robidoux <i>et al.</i> , 2001)
Forestier	14	> 500	500	> 500	(Philips <i>et al.</i> , 1993)
Forestier	14	> 711	711	> 711	(Robidoux <i>et al.</i> , 2002)
Toxicité chronique – Nombre de cocons					
Artificiel	56	< 280	< 280	280	(Robidoux <i>et al.</i> , 2000)
Artificiel	56	64	<280	280	(Robidoux <i>et al.</i> , 2001)
Forestier	56	11.3	< 15.6	< 15.6	(Robidoux <i>et al.</i> , 2002)
Forestier	56	>15.2	>15.2	15.2	(Savard <i>et al.</i> , 2005)
Pâturage frais	56	8.5	15.6	36	(Simini <i>et al.</i> , 2004a)
Pâturage vieilli	56	-	562	>562	(Simini <i>et al.</i> , 2004a)
Pâturage frais	56	4.3	5.9	11.2	(Simini <i>et al.</i> , 2004b)
Pâturage vieilli	56	-	19	-	(Simini <i>et al.</i> , 2004b)
Sablonneux SSL	56	2.7	-	-	(Kuperman <i>et al.</i> , 2007)
Sablonneux RDDC	56	9.12	4.59	13.34	(Berthelot <i>et al.</i> , 2008a)
Toxicité chronique – Nombre de juvéniles					
Forestier	56	15.8	29.5	63.5	(Robidoux <i>et al.</i> , 2002)
Forestier	56	>15.2	>15.2	15.2	(Savard <i>et al.</i> , 2005)
Pâturage frais	56	1.2	6.5	11.2	(Simini <i>et al.</i> , 2004a)
Pâturage vieilli	56	-	562	>562	(Simini <i>et al.</i> , 2004a)
Pâturage frais	56	0.25	5.9	11.2	(Simini <i>et al.</i> , 2004b)
Pâturage vieilli	56	-	19	-	(Simini <i>et al.</i> , 2004b)
Sablonneux SSL	56	0.4	-	-	(Kuperman <i>et al.</i> , 2007)

1.3.2.4 Effets du HMX sur les MTs et/ou MTLPs

La synthèse de MTs ou de MTLPs peut être induite non seulement par les métaux, mais également par une grande variété de facteurs endogènes et exogènes, naturels ou artificiels (voir § 1.2.2.4). Comme les autres facteurs non métalliques, il est possible que le HMX se transforme ou soit transformé dans les cellules en dérivé alkylant et qu'il provoque ainsi l'oxydation des MTLPs, libérant ainsi le zinc physiologique et déclenchant l'induction de nouvelles quantités de MTLPs. Il s'agirait alors d'un mécanisme direct d'induction.

À l'instar d'autres substances énergétiques, l'existence d'un pouvoir oxydant chez le HMX a été suggérée mais n'a pas encore été vérifiée (Savard, 2005; Berthelot *et al.*, 2008a). Il est cependant reconnu qu'une induction des MTs ou de MTLPs constituerait une réponse à ce type de stress (Klaassen *et al.*, 1999; Ndayibagira *et al.*, 2007). Il serait en effet probable que le HMX provoque la formation de radicaux libres dans les cellules, et ainsi ces derniers oxydèrent les MTs qui libéreraient alors le Zn physiologique. Il s'agirait alors d'un mécanisme indirect.

De ce fait, le HMX pourrait être considéré comme un inducteur potentiel des MTs ou MTLPs. Mais il serait alors très important de caractériser le HMX pour son propre pouvoir oxydant (de sa liaison ou de la liaison de ses dérivés aux MTs ou MTLPs) ou pour son pouvoir de formation de radicaux libres. Jusqu'à maintenant, la littérature ne rapporte aucune étude sur l'effet de substances énergétiques comme le HMX sur l'accumulation de MTs ou MTLPs.

Cette étude est la première, jusqu'à présent, à mesurer la concentration de MTLPs dans les tissus de vers de terre *E. andrei* exposés au HMX via les sols.

1.3.3 Le cadmium

1.3.3.1 Considérations générales

Le cadmium (Cd) est très toxique et possède des effets variés sur les fonctions de divers organes (Lindman, 2005). D'après la Loi Canadienne pour la Protection de l'Environnement (LCPE, 1999), le Cd pénètre dans l'environnement en quantités ou concentrations qui peuvent être dangereuses et qui peuvent avoir un effet néfaste sur les organismes et l'environnement. Le Cd est toujours associé au Zn et constitue un sous-produit de l'extraction minière du Zn, du Pb et du Cu. Le Cd s'accumule dans les organismes intoxiqués comme les vers de terre au niveau du rein primitif où il détruit les mécanismes de filtrage. D'autres effets potentiels du Cd sur les organismes sont observés, tels qu'une atteinte du système digestif, des dommages à l'ADN, au système nerveux central et au système immunitaire ainsi qu'une prédisposition au développement de cancer. Le Cd peut aussi atteindre différentes parties du système reproducteur, endommageant les tissus et provoquant l'infertilité de l'individu exposé (Lenntech, 2004 ; Klaassen, 1995; Klaassen *et al.*, 1999). En effet, la toxicité du Cd peut être spécifique aux gonades chez la souris et l'humain, en particulier au niveau des testicules (Klaassen, 1995; Waalkes et Klaassen 1985), et chez le ver de terre, en particulier aux niveaux des ovaires (Siekierska et Urbanska-Jasik, 2002). Sous forme ionique, le Cd inhibe les réactions impliquant les métalloprotéines; il entre en compétition avec le Zn et les autres métaux qui, normalement couplés à la MT, favorisent les réactions mettant en jeu des enzymes comme l'anhydrase carbonique, la superoxyde dismutase, l'aldolase, l'ADN polymérase, l'ARN polymérase, la carboxypeptidase A, la pyruvate carboxylase et l'alcool déshydrogénase ainsi que certains facteurs de transcription (Suzuki *et al.* 1993, Roesijadi *et al.*, 1994a).

Les vers de terre sont capables de bioaccumuler dans leurs tissus de grandes quantités de Cd à partir de sols contaminés (Ireland, 1975, Martin et Coughtrey, 1975, Morgan et Morgan, 1988). De ce fait, les vers de terre sont plus

susceptibles à la pollution par les métaux que plusieurs autres groupes d'invertébrés. (Bengtsson *et al.*, 1992). L'exposition au Cd se fait généralement via l'ingestion de nourriture, mais une absorption par la voie cutanée via l'eau interstitielle a été démontrée chez les organismes terrestres (Lindman, 2005; Vijver *et al.*, 2003). Chez les vers de terre, deux mécanismes intracellulaires responsables de l'accumulation des métaux coexistent. Le premier implique la rétention des métaux (en particulier le Pb) dans les granules phosphates insolubles appelés chlorosomes (Morgan et Morris, 1982; Morgan et Morgan, 1988; voir paragraphe 1.4.3.2 pour plus de détails). Le second, qui nous intéresse ici, fait intervenir les ligands riches en soufre comme les MTs et MTLPS (Suzuki *et al.*, 1980; Yamamura *et al.*, 1981) qui sont capables de lier les métaux (en particulier le Cd) à l'intérieur de structures appelées cadmosomes (Morgan et Morgan, 1990; Morgan *et al.*, 1993). De grandes concentrations en Cd peuvent affecter la densité, la viabilité, la production de cocons, la croissance et le développement sexuel de ces organismes (Bengtsson *et al.*, 1983; Spurgeon *et al.*, 1994).

1.3.3.2 Recommandations pour la qualité de l'environnement

Le Conseil Canadien des Ministres de l'Environnement (CCME) a établi des recommandations au sujet de la qualité de l'environnement (Canadian Environmental Quality Guidelines, CEQG), et en particulier pour le Cd dans les sols, équivalant à 1,4, 10, 22 et 22 mg/kg sol sec pour les sols agraires (ASQG), résidentiels, commerciaux et industriels (ISQG), respectivement (CCME, 2006). L'Agence de protection de l'environnement des États-Unis (USEPA) a aussi mis en place des recommandations officielles Eco-SSL concernant les concentrations en Cd dans les sols et leurs effets sur la faune et la flore (USEPA, 2005). En particulier, l'Eco-SSL pour les invertébrés terrestres est de 140 mg Cd /kg sol sec.

1.3.3.3 Concentrations dans les sols de type militaire

Les concentrations en Cd dans les sols de type militaire (Robidoux *et al.*, 2000a; Ampleman *et al.*, 2004; Marois *et al.*, 2004; Thiboutot *et al.*, 2004) tombent bien au-delà des recommandations. Par exemple, à la base des Forces Canadienne de Wainwright (Wainwright CFB, ON), on a relevé jusqu'à 31 ppm de Cd (Tableau 1.8, Robidoux *et al.*, 2000a), ce qui représente des concentrations supérieures aux valeurs-seuils de qualité des sols industriels mises en place par le CCME (ISQG, CCME, 2006). À la base des Forces Canadiennes de Valcartier (Valcartier CFB, QC), le sol du champ de tir antitank d'Arnhem contenait entre 27,3 et 33,9 mg Cd/kg sol sec près des positions de tir (>ISQG, CCME, 2006) (Marois *et al.*, 2004). Au CLAWR (AB), les échantillons de sol prélevés dans la zone de bombardement Jimmy Lake présentaient entre 6,3 et 14,9 mg Cd/kg sol sec, ce qui dépasse largement les valeurs-seuils pour la qualité des sols voués à l'agriculture mises en place par le CCME (ASQG, CCME, 2006) (Ampleman *et al.*, 2004). A la base des Forces Canadiennes de Gagetown, (Gagetown CFB, NB), la concentration maximale de Cd dans les sols (4550 mg Cd/kg sol sec, >ISQG, CCME, 2006) a été observée près des zones de combustion des substances énergétiques partiellement ou non explosées ("propellant burning pads") (Thiboutot *et al.*, 2004).

La contamination des sols utilisés pour l'entraînement militaire au Canada est donc un réel problème, pour les Forces Armées Canadiennes qui utilise ou ont utilisé ces terrains et désirent les revaloriser et pour les ministères de l'environnement des provinces canadiennes qui ont soulevé le débat. Il a souvent été objecté que la contamination est certes importante mais plutôt locale et sporadique à la vue des données récoltées jusqu'à maintenant. Malheureusement on ne sait peu ou rien sur la diffusion de tels contaminants dans l'environnement, comme le passage dans la nappe phréatique et la contamination subséquente des rivières, lacs et autres zones d'eau des régions avoisinantes des sites militaires, tout comme la contamination de l'air, de la faune et de la flore, et les répercussions sur la chaîne alimentaire.

Tableau 1.8. Concentrations en Cd retrouvées dans les sols de RTA au Canada.

Base militaire	RTA		[Cd] (mg/kg sol sec)	SQG	Références
Wainwright CFB, Ontario	-	Champ de tir	Max. 31	>ISQG	Robidoux <i>et al.</i> , 2000a
Valcartier CFB, Quebec	Arnhem	Position de tir	27.3-33.9	>ISQG	Marois <i>et al.</i> , 2004
	Vaucelles	Champ de tir	1.70-8.52	>MBG	
	Termoli	Buttes d'impact	1.22-5.77	>MBG	
	Batoche	Champ de tir	2.69-3.25	>MBG	
CLAWR, Alberta	Jimmy Lake	Champ de tir	6.30-14.90	>ASQG	Ampleman <i>et al.</i> , 2004
	Shaver River	Champ de tir	0.70-3.10	>ASQG	
Gagetown CFB, New Brunswick	Wellington	Cibles	0.70-10.7	>ASQG	Thiboutot <i>et al.</i> , 2004
		Position de tir	Max. 3.8	>MBG	
	EOD bunks		0.4-12.2	>ASQG	
	Propellant burning pads		Max. 4550	>ISQG	

- : donnée non disponible

SQG : "Soil Quality Guidelines"

>ASQG (CCME, 2006): supérieur au "Agrarian Soil Quality Guideline"

>ISQG (CCME, 2006): supérieur au "Industrial Soil Quality Guideline"

>MBG (CCME, 2006): supérieur à la valeur "Mean Background" (valeur moyenne aux alentours de la zone)

1.3.3.3 Effets biologiques du Cd

Le Cd possède des effets délétères sur la prise de nourriture, l'assimilation de cette nourriture et sur certains paramètres biochimiques (taux de lipides et glucides) chez l'espèce *Daphnia magna* (zooplancton) (Bodar *et al.*, 1988). Ces auteurs ont aussi suggéré lors cette étude une possible implication du Cd dans les troubles de la reproduction observés chez cette espèce. Marinussen *et al.* (1997) ont observé les effets néfastes du Cd chez le ver aquatique *Dendrobaena veneta*. Par la suite, Chapman *et al.* (1999) ont montré que le Cd est un produit toxique vis-à-vis des écosystèmes aquatiques en utilisant les oligochètes *Lumbriculus variegatus* and *Tubifex tubifex* dans des sédiments artificiels amendés.

Le Cd est létal pour le ver de terre (Tableau 1.9) et agit aussi sur leur reproduction (tableau 1.9). Le tableau 1.9 montre les effets délétères sur la survie des adultes et la production de cocons, deux paramètres importants d'un point de vue écotoxicologique (USEPA, 2003; 2005). Brièvement, le Cd se révèle très toxique vis-à-vis des vers de terre, diminuant leur capacité de pontes et l'éclosion des cocons. Quelque soit le sol utilisé, les effets adverses du Cd sont visibles pour des concentrations relativement faibles. Non cité dans le tableau, Spurgeon et Hopkin (1996) ont observé une diminution significative de la croissance, du développement et de la production de cocons du ver *E. andrei* exposé à des sols naturels contaminés par le Cd. Van Gestel *et al.* (1991) ont aussi observé une CSEO et une CE₅₀ de <10 et de 108 mg Cd/kg sol sec (sol artificiel), respectivement, pour un paramètre inusité, le développement sexuel de *E. andrei* (nombre d'adultes matures vs. immatures).

Le Cd affecte aussi la croissance des vers de terre (Van Gestel *et al.*, 1991; 1992; Spurgeon *et al.*, 1994). Par exemple, Van Gestel *et al.* (1991) ont observé une CSEO et une CE₅₀ pour la croissance en sol artificiel de 32 et de 96 mg Cd/kg sol sec, respectivement.

Tableau 1.9. Toxicité aiguë (létalité) et chronique (diminution du nombre de cocons) du Cd chez *Eisenia sp.* dans différents type de sols

Forme	Sol	Temps d'exposition (j)	CL ₅₀ / CE ₅₀ (mg/kg sol d.w.)	CSEO (mg/kg sol d.w.)	Référence
Toxicité aiguë – Létalité					
CdCl ₂	Naturel	42	500	-	(Ma <i>et al.</i> , 1983)
CdCl ₂	Artificiel	14	1843	-	(Neuhauser <i>et al.</i> , 1985)
CdCl ₂	Artificiel	14	>1000	-	(Van Gestel et Van Dis, 1988)
CdCl ₂	Naturel	14	320-560	-	(Van Gestel et Van Dis, 1988)
CdCl ₂	Artificiel	28	588	-	(Van Gestel <i>et al.</i> , 1991)
		42	552		
		56	421		
		70	303		
		84	253		
CdCl ₂	Artificiel	28	>1000	-	(Van Gestel <i>et al.</i> , 1992)
Cd(NO ₃) ₂	Artificiel	28	>300	>300	(Spurgeon <i>et al.</i> , 1994)
Cd(NO ₃) ₂	Artificiel	28	374	-	(Fitzpatrick <i>et al.</i> , 1996)
Toxicité chronique – Nombre de cocons					
Cd (COOH) ₂	Artificiel	56	25	-	(Malecki <i>et al.</i> , 1982)
CdCl ₂	Artificiel	56	50	-	(Malecki <i>et al.</i> , 1982)
CdCl ₂	Naturel	84	-	10	(Ma <i>et al.</i> , 1983)
CdCl ₂	Artificiel	14	-	<10	(Van Gestel <i>et al.</i> , 1992)
CdCl ₂	Artificiel	56	46.3	39.2	(Spurgeon <i>et al.</i> , 1994)

- : données non disponibles

1.3.3.4 Effets du Cd sur les MTs et/ou MTLPs

L'induction de MTs a été démontrée dans certains tissus du bivalve *A. grandis* exposé à de fortes concentrations de Cd en laboratoire et en milieu naturel (Campbell *et al.*, 1990). L'analyse statistique montre que les niveaux de MT sont corrélés de façon significative avec les concentrations en ions Cd^{2+} libres dans l'eau et avec les concentrations dans les tissus (Campbell *et al.*, 1990). La MT a souvent été utilisée afin de caractériser la pollution de certains écosystèmes aquatiques par le Cd. En effet, l'induction de MTs par un gradient métallique dans l'eau ou par une accumulation de Cd dans les tissus ont été observées avec succès chez certains bivalves d'eau douce (Couillard *et al.*, 1993; Perceval *et al.*, 2002) ou d'eau de mer (Roesijadi *et al.*, 1996) et chez des invertébrés marins (Pedersen *et al.*, 1998; Gillis *et al.*, 2002). Précédemment, Olsson et Haux (1986), puis Brown *et al.* (1987) avaient observé une certaine relation entre la séquestration de Cd chez les poissons et l'accumulation de MTs dans leurs tissus.

Afin de caractériser la contamination des écosystèmes terrestres par le Cd, Trinchella *et al.* (2006) ont observé, après une intoxication, l'expression de MTs dans les tissus de lézards, car ceux-ci constituent une proie de choix pour de nombreux oiseaux. Dallinger *et al.* (1997 à 2004c) ont amplement étudié la réponse de la MT des gastropodes vis-à-vis une exposition au Cd et ont récemment suggéré l'utilisation de cette métalloprotéine comme biomarqueur. Concernant le ver de terre, il a été démontré que non seulement une MT liant le Cd était présente, mais que cette métalloprotéine était induite par ce métal après exposition (Suzuki *et al.*, 1980; Yamamura *et al.*, 1981). Plus tard, Furst et Nguyen (1989) ont observé l'induction de deux isoformes de la MT par le Cd. L'expression du gène codant pour la MT et la subséquente induction par le Cd a fait l'objet d'études récentes (Spurgeon *et al.*, 2004a; 2004b; Galay-Burgos *et al.*, 2005; Demuynck *et al.*, 2006). Après avoir étudié les effets du Cd sur les MTLPs du ver *E. andrei*, Ndayibagira *et al.* (2007) ont démontré leur induction dose-dépendante et le potentiel de ces métalloprotéines comme biomarqueur d'exposition et d'effet biologique précoce.

1.3.4 Le plomb

1.3.4.1 Considérations générales

Le plomb (Pb) est l'un des quatre métaux les plus nocifs pour les organismes et l'environnement. Pour cette raison, la LCPE l'a classé parmi la liste des substances toxiques à surveiller (LCPE, 2003). Le Pb peut se retrouver sous différentes formes dans l'environnement (Weast, 1985). Dans le sol, il forme des complexes avec la matière organique et les minéraux de l'argile ce qui diminue sa mobilité (USEPA, 2003). En fait, la partie soluble du Pb dans les sols ne représente que 1 à 10% du Pb total (NRC, 1973). La biodisponibilité du Pb dans un sol dépend de nombreux facteurs tels la capacité d'échange de cations, la composition du sol (e.g. quantité de matière organique et de calcium), les concentrations en métaux, les précipitations, la lumière et la température (USEPA, 2003; Berthelot *et al.*, 2008a). Le plomb peut pénétrer un organisme de façon passive par ingestion de nourriture, d'air et d'eau ainsi que par exposition cutanée. Chez la plupart des espèces vivantes, le Pb peut avoir plusieurs effets indésirables, notamment une perturbation dans la biosynthèse de l'hémoglobine et une anémie, une augmentation de la pression artérielle, des problèmes au niveau des reins (néphridies et néphridiospores chez le ver de terre), une perturbation du système nerveux et des dommages au cerveau. Un autre effet néfaste et provoqué par le Pb résulte en une diminution de la fertilité chez l'individu et des dommages à l'embryon (Lenntech, 2004 ; Klaassen, 1995). Le Pb interfère notamment avec l'activité enzymatique des phosphatases acides, de l'ATPase, de l'anhydrase carbonique et l'acétylcholinestérase (Greenwood et Earnshaw, 1984).

Les vers de terre absorbent le Pb présent dans l'environnement, mais ne l'excrètent pas efficacement (Davies *et al.*, 2003a). Davies *et al.* (2003a) ont démontré que les vers bioaccumulent graduellement le Pb et qu'il était possible d'atteindre des niveaux toxiques dans le ver même pour de faibles contaminations de métal suite à une longue période d'exposition. Les vers peuvent toutefois tolérer

des concentrations relativement élevées de Pb (tableau 1.11), car il semble que ce métal soit emmagasiné sous une forme non-toxique dans le ver (Morgan *et al.*, 1999). Le lieu principal de stockage du Pb chez le ver est le tissu chloragogène. Ce dernier est constitué de cellules épithéliales modifiées en périphérie de l'intestin. En effet, le Pb est essentiellement accumulé à l'intérieur du canal alimentaire postérieur: l'accumulation du Pb à cet endroit préviendrait la dissémination d'importantes quantités de ce métal vers d'autres tissus du ver de terre et pourrait présenter une stratégie de détoxification basée sur une immobilisation accumulative (Morgan et Morgan, 1990). Des études menées précédemment avec des chloragosomes isolés ont montré que ces organelles intracellulaires lient le Pb de façon très importante (Ireland, 1978; Morgan et Morris, 1982; Morgan et Morgan, 1989). La majeure partie du Pb serait donc emmagasinée dans les chloragosomes des chloragocytes (Hopkin, 1989). Même si une exposition faible et de courte durée n'a que peu d'effet sur sa croissance, une exposition à long terme pourrait toutefois entraîner une diminution de fécondité (Ireland, 1983; Morgan et Morris, 1982; Morgan et Morgan, 1989).

1.3.4.2 Recommandations pour la qualité de l'environnement

Actuellement, le Conseil Canadien des Ministres de l'Environnement (CCME, 2006) recommande que les valeurs soient de 70, 140, 260 et 600 mg/kg sol sec pour le Pb dans les sols agraires, résidentiels, commerciaux et industriels respectivement. L'Agence de protection de l'environnement des États-Unis (USEPA) a aussi mis en place des recommandations officielles Eco-SSL concernant les concentrations en Pb dans les sols et leurs effets sur la faune et la flore (USEPA, 2005). En particulier, l'Eco-SSL dérivé pour les invertébrés terrestres est de 1700 mg Pb /kg sol sec.

1.3.4.3 Concentrations dans les sols de type militaire

Les concentrations de Pb dans les sols de type militaire (Robidoux *et al.*, 2000a; Ampleman *et al.*, 2004; Marois *et al.*, 2004; Thiboutot *et al.*, 2004) tombent bien au-delà de ces limites (Tableau 1.10).

A la base des Forces Canadiennes de Wainwright (Wainwright CFB, ON), jusqu'à 3300 ppm de Pb ont été retrouvés au devant d'une cible (Robidoux *et al.*, 2000a).

A la base des Forces Canadiennes de Gagetown (Gagetown CFB, NB), les échantillons de sols collectés sur le site de Wellington (Wellington antitank range) contenaient entre 108 et 505 mg Pb/kg sol sec au-devant des cibles (>MBG). Les concentrations en plomb les plus élevées ont été observées dans les sols collectés près des zones de combustion des UXOs partiellement ou non explosées ("propellant burning pads") et au champ de tir Vimy, soit respectivement 68700 mg Pb/kg sol sec (>ISQG, CCME, 2006) et 88200 mg Pb/kg sol sec (>ISQG, CCME, 2006) (Thiboutot *et al.*, 2004).

A la base des Forces Canadiennes de Valcartier (Valcartier CFB, QC), les échantillons de sols collectés au champ de tir de Batoche contenaient de 3810 à 8530 mg Pb/kg sol sec (>ISQG, CCME, 2006). Les concentrations maximales en Pb ont été observées dans les sols des champs de tir de Famagusta et de Nicosie, soit >10,000 mg Pb/kg sol sec près des positions de tirs (>ISQG, CCME, 2006) (Marois *et al.*, 2004).

Le tableau 1.10 présente les concentrations en Pb retrouvées dans les sols de quelques terrains consacrés à l'entraînement militaire au Canada.

Tableau 1.10. Concentrations en Pb retrouvées dans les sols de RTA au Canada.

Base militaire	RTA		[Pb] (mg/kg sol sec)	SQG	Références
Wainwright CFB, ON	-	Cibles	Max. 3300	>ISQG	Robidoux <i>et al.</i> , 2000a
CLAWR, AB	Jimmy Lake	Champ de tir	3-31	-	Ampleman <i>et al.</i> , 2004
	Shaver River	Champ de tir	3-37	-	
Valcartier CFB, QC	Arnhem	Champ de tir	20.9-66.6	>MBG	Marois <i>et al.</i> , 2004
	Liri	Positions de tir	17.3-2792	>ISQG	
		Cibles	141-1635	>ISQG	
	Vaucelles	Champ de tir	84-643	>MBG	
	Batoche	Champ de tir	3810-8530	>ISQG	
	Famagusta	Positions de tir	63.5- >10,000	>ISQG	
		Buttes d'impact	36.4-170.5	>MBG	
	Nicosie	Positions de tir	336- >10,000	>ISQG	
		Buttes d'impact	36.4-93.7	>MBG	
	Hochwald	Positions de tir	1095-3190	>ISQG	
Gagetown CFB, NB	Wellington	Cibles	108-505	>MBG	Thiboutot <i>et al.</i> , 2004
		Positions de tir	12.4-114	>MBG	
	Newcastle	Champ de tir	6.1-27	-	
	Hersey EOD bunks	Avant detonation	7.9-10.8	-	
		Après detonation	9.2-108	>MBG	
	Vimy	Champ de tir	98.8-88200	>ISQG	
	« propellant burning pads »		61.1-68700	>ISQG	

- : donnée non disponible

>ISQG (CCME, 2006) supérieur au "Industrial Soil Quality Guideline"

>MBG (CCME, 2006) supérieur à la valeur "Mean BackGround" (valeur moyenne aux alentours du site)

1.3.4.3 Effets biologiques du Pb

L'invertébré aquatique *Daphnia magna* est une espèce particulièrement sensible au Pb, alors que ce métal possède des effets délétères sur la croissance et la reproduction de cette espèce. Après 19 jours, sa capacité de reproduction est fortement diminuée, et ce, à de faibles concentrations, avec des EC₂₅ et EC₅₀ de environ 1 et 10 µg Pb / L, respectivement. La croissance de *D. magna*, contrairement à la reproduction, est stimulée par de faibles concentrations en Pb (moins de 64 µg Pb / L), mais diminue de façon significative à la plus haute concentration (256 µg Pb / L) (Berglind *et al.*, 1985).

Le plomb est aussi létal pour le ver de terre *E. andrei* (Tableau 1.11) et il agit aussi sur les fonctions reproductives des vers de terre, en diminuant notamment la production de cocons produit et ce quelque soit le type de substrat utilisé (Tableau 1.11). Reinecke et Reinecke (1997) ont observé des dommages cellulaires causés par le plomb au niveau structurel des spermatozoïdes du ver *Eisenia foetida*. Ces dommages incluait des bris et des pertes de membranes nucléaires et flagellaires, de malformations de l'acrosome et des pertes de matériel nucléaire. Le tableau 1.11 présente les CL₅₀ /CE₅₀ et les CSEO du Pb pour les paramètres les plus importants et les plus significatifs, comme la létalité du produit (toxicité aigu) et la diminution du nombre de cocons (paramètre de reproduction, toxicité chronique). Souvent réalisées avec des sols plus ou moins proche, artificiel ou naturel, cela nous donne de nombreux et pertinents ponts de comparaison pour notre étude. De plus, ces études ont montré que le temps d'exposition (Neuhauser *et al.*, 1985; Spurgeon *et al.*, 1994; Spurgeon et Hopkin, 1995), la méthode d'amendement des sols ou le mode de contamination (Davies *et al.*, 2003a; 2003b) et les caractéristiques chimiques et physiques des sols (Savard *et al.*, 2005; Berthelot *et al.*, 2008a) sont des composantes essentielles qui affectent la toxicité aiguë et chronique du Pb envers le ver *E. andrei*.

Tableau 1.11. Toxicité aiguë (léthalité) et chronique (diminution du nombre de cocons) du plomb chez *Eisenia sp* dans différents types de sols.

Forme	Type de sol	Exposition (j)	CL ₅₀ /CE ₅₀ (mg/kg)	CSEO (mg/kg)	CME0 (mg/kg)	Référence
Toxicité aiguë – Létalité						
Aqueuse	Artificiel	14	5311	3000	-	(Neuhauser <i>et al.</i> , 1985)
Aqueuse	Artificiel	14	4480	2000	10000	(Spurgeon <i>et al.</i> , 1994)
Aqueuse	Artificiel	56	3760	2190	10000	(Spurgeon et Hopkin, 1995)
Aqueuse	Artificiel	28	5395	3000	5000	(Davies <i>et al.</i> , 2003a)
Solide	Artificiel	28	5292	3125	5000	(Davies <i>et al.</i> , 2003b)
Aqueuse	Forestier	28	6067	-	-	(Savard <i>et al.</i> , 2005)
Aqueuse	Sablonneux	28	579	359	623	(Berthelot <i>et al.</i> , 2008a)
Toxicité chronique – Nombre de cocons						
Aqueuse	Artificiel	56	1940	1810	2000	(Spurgeon <i>et al.</i> , 1994)
Aqueuse	Artificiel	56	1629	608	2000	(Spurgeon et Hopkin, 1995)
Solide	Artificiel	56	993	625	1200	(Davies <i>et al.</i> , 2003b)
Aqueuse	Forestier	56	1175	1517	3033	(Savard <i>et al.</i> , 2005)
Aqueuse	Sablonneux	56	80.8	57	97	(Berthelot <i>et al.</i> , 2008a)

- : données non disponible

1.3.4.4 Effets du Pb sur les MTs et/ou MTLPs

L'induction de la synthèse de MTs et/ou MTLPs est reconnue comme une réponse au stress causé par les métaux (Roesijadi 1994a; 1994b; Klaassen, 1995; Ndayibagira *et al.*, 2007) mais leur induction potentiel après une exposition au Pb est toujours débattue. Quelques études suggèrent l'existence d'un métallothionéine spécifique au Pb, notamment chez les mammifères, alors que d'autres études ne reportent aucune induction de synthèse de MTs ou de MTLPs après une exposition au Pb. Jusqu'à présent, le mécanisme potentiel d'induction des MTs par le Pb est très mal compris (Park *et al.*, 2001). À ce jour, aucune étude ne reporte l'induction de MTLPs par le Pb ou de MTLPs spécifique au Pb, ni chez le ver de terre, ni chez d'autres invertébrés aquatiques ou terrestres, ce qui pourrait limiter les comparaisons entre nos résultats et ce qui a été fait par d'autres chercheurs. Nous ne pouvons évoquer que la récente étude effectuée par Homa *et al.* (2005), dans laquelle il n'a été observé aucune augmentation par rapport aux témoins de l'expression de MT-2 dans des coelomocytes de vers exposés à 5.81mg Pb /cm² d.w. sur papier filtre pendant 3 jours. Certains scientifiques ont toutefois réussi à induire des quantités mesurables de MT chez des animaux supérieurs après exposition au Pb. En effet, Waalkes et Klaassen (1985) ont les premiers démontré que le Pb augmente seulement la concentration hépatique de MT chez des rats traités. Par la suite, Jordan *et al.* (1990) ont observé une induction deux fois plus importante que le contrôle de la MT dans le foie de Canard de Pékin après que ceux-ci aient ingéré une nourriture contaminée (58ppm de Pb). Toutefois, Garrett *et al.* (1998) n'ont observé aucune induction in vitro de MT après le traitement de cellules HPT ("Human proximal tubules cells") avec des ions Hg²⁺, Ag²⁺, et Pb²⁺, aucun effet sur le niveau de d'ARN messenger de MT-1 n'ayant été trouvé ni à des concentrations sublétales, ni même à des concentrations létales. Trois hypothèses peuvent être émises à partir des quelques éléments de la littérature à ce sujet :

- 1) Le Pb n'induit tout simplement pas, directement ou indirectement, de MTs au dessus des valeurs basales. Les MTs spécifiques au Pb sont particulièrement absentes des coelomocytes de l'espèce *E. andrei* comme décrit par Homa *et al.*

(2005). En effet le Pb est reconnu pour avoir une grande affinité pour la MT *in vitro* (Waalkes *et al.*, 1984) mais il ne se lie qu'en petite quantité à la MT *in vivo* (Waalkes et Klaassen, 1985). De plus, le Pb a aussi été identifié par Park *et al.* (2001) comme un inducteur indirect des MTs car il induit celle-ci *in vivo* mais pas *in vitro*. Le Pb est d'ailleurs généralement stocké chez le ver sous une forme non-toxique (Morgan *et al.*, 1999) et dans des cellules spécialisées appelées chloragocytes (Hopkin, 1989), donc il n'y aurait aucune réponse observable des MTLPs dans le cas de vers exposés au Pb.

2) Les MTs sont induites par le Pb, directement ou indirectement, mais de façon limitée au dessus des valeurs basales et cela demeure indétectable. Une étude *in vivo* réalisée par Nielson *et al.* (1985) montre que de faibles concentrations de Pb ne causent qu'un relargage partiel du Zn lié de façon physiologique aux MTs. Par contre, un excès des ions Pb conduit à un déplacement total du Zn physiologique. *A fortiori*, un déplacement incomplet du Zn physiologique par le Pb bioaccumulé dans l'organisme, comme suggéré par Nielson *et al.* (1985), résulterait en une synthèse limitée de nouvel ARN messager et donc à une faible augmentation des concentrations en MTs. On sait déjà que cette étape de déplacement du Zn par le métal exogène toxique est un aspect important dans le mécanisme d'induction des MTs (Klaassen *et al.*, 1995; Klaassen *et al.*, 1999);

3) Les MTs sont induites par le Pb et lient ce métal mais le complexe formé par le Pb et la MT n'est pas stable, comme démontré par Ikebuchi *et al.* (1986) à partir de foie de rat. Cette étude traite de l'induction de la synthèse d'une protéine de type métallothionéine liant le Pb présente dans le foie de rats exposés à des doses sublétales d'acétate de plomb. Lors de cette étude, et de façon intéressante, les complexes Pb-MTLPs formées étaient instables et ont relâché graduellement le Pb lors de l'isolation de la protéine. Les Pb-MTLPs se sont rapidement dégradées et 24 heures après l'administration de l'acétate de Pb, la plupart de ces complexes métal-protéines ont disparu des foies de rat traités. Un tel schéma de relargage du Pb et de dégradation des MTLPs pourrait fortement être possible chez des espèces inférieures comme les vers *E. andrei*, donc il serait impossible de détecter une induction de synthèse des MTLPs dans les échantillons de vers exposés au Pb.

1.4 Les sols

1.4.4 Considérations générales

Le tableau 1.12 présente les caractéristiques physico-chimiques des principaux sols utilisés lors d'études concernant les effets de différents produits toxiques sur les vers de terre et autres invertébrés terrestres.

1.4.5 Biodisponibilité

Lock et Janssen (2001a, 2001b) ont observé une toxicité du Cd chez les invertébrés terrestres comme *E. andrei*, *Enchytraeus albidus* et *Folsomia candida* et ont rappelé que les paramètres physiques du sol et la biodisponibilité du Cd dans ce même sol modulent la réponse de ces invertébrés. Lors d'une étude plus ancienne, Van Gestel et Van Dis (1988) avaient démontré que la réponse des vers de terre à la toxicité d'un métal était fortement modulée par les caractéristiques du sol. Par exemple, ils ont montré que le Cd était létal pour *E. andrei*, avec une CL₅₀ variant entre 320-560 mg Cd/kg sol sec (sol sablonneux) ou de >1000 mg Cd/kg sol sec (sol artificiel). Par la suite, Peijnenburg *et al.* (1999) observaient l'accumulation du Cd chez *E. andrei* et sa biodisponibilité en parallèle avec l'observation minutieuse des caractéristiques des sols. Ces chercheurs parviendront aux mêmes conclusions que les études précédentes de Van Gestel, avançant que les paramètres physiques des sols sont importants lorsque l'on utilise les tests de toxicité avec *E. andrei*. Les caractéristiques physiques et chimiques diffèrent en fonction du type de sol et de l'endroit où celui-ci a été prélevé. En effet, la nature des sols diffère qu'ils soient artificiels ou naturels forestiers, naturels sablonneux ou naturels argileux (Davies *et al.*, 2003a; 2003b; Savard 2005; Berthelot *et al.*, 2008a).

1.4.6 Contaminations mixtes

Nous avons vu précédemment que les sols provenant de RTA au Canada et aux USA sont contaminés par des mixtures de produits potentiellement toxiques (Robidoux *et al.*, 2000a; Ampleman *et al.*, 2004; Marois *et al.*, 2004; Thiboutot *et al.*, 2004). Dans cette optique d'élucidation des effets de contaminations mixtes, Savard *et al.* (2005) ont étudié les effets de mélanges de Pb et de HMX sur certaines activités enzymatiques et la reproduction de ver *E. andrei*. Les résultats obtenus ont démontré une certaine additivité des effets des produits toxiques (Savard *et al.*, 2005).

Tableau 1.12 Caractéristiques physico-chimiques des principaux sols utilisés lors d'études écotoxicologiques sur les vers de terre et autres invertébrés terrestres.

Sol	Type de sol	Provenance	Granulométrie (%)	Matière Organique (%)	Humidité (%)	pH	Références
RDDC	Naturel Sablonneux	Valcartier CFB, Qc	Sable : 98 Silice : 17 Argile : 0.2	1.2	<1	4.4	Berthelot et al., 2008a
SSL#1	Naturel Pâturage Sablonneux	USA	Sable : 69 Silice : 13 Argile : 17	1.2	<1	5.2	Simini et al., 2004
SSL#2	Naturel Pâturage Sablonneux	USA	Sable : 71 Silice : 18 Argile : 11	1.2	<1	5.0	Kuperman et al., 2004
RacFor 2002#1	Naturel Forestier Sablonneux	Boucherville , Qc	Sable : 82 Silice : 9 Argile : 8	2.8	14	7.6	Robitoux et al., 2002
RacFor 2002#2	Naturel Forestier Sablonneux	Boucherville , Qc	Sable : 83.8 Silice : 9 Argile : 1.2	-	35	7.2	Sévard et al., 2007
Broughton Loam	Naturel Argileux	Kettering, UK	Sable : 24 Silice : 35 Argile : 41	10	-	7.1	Spurgeon et al., 2004a Spurgeon et al., 2004b
OCDE	Artificiel	-	Sable : 70 Silice : 10 Argile : 20	1	35	6.8	Van Gestel et al., 1991 Van Gestel et al., 1992 Phillips et al., 1993 Robitoux et al., 2001 Spurgeon et al., 1994 Spurgeon et al., 1995

1.5 Objectifs généraux et spécifiques de l'étude

Il s'agit tout d'abord de décrire la toxicité globale des métaux sélectionnés (Cd et Pb), ainsi que de la substance énergétique (HMX) dans un sol typique des RTA grâce à des paramètres pertinents d'un point de vue écotoxicologique (e.g. reproduction, changements de poids et mortalité). Par la suite et dans un premier temps, nous examinerons si une modulation des MTLPs dans un tissu spécifique (gonades, clitellum ou tissus non impliqués dans la reproduction) du ver *E. andrei* peut être associée à des effets du Cd sur la reproduction. Finalement, nous verrons s'il y a une accumulation préférentielle de MTLPs dans un ou plusieurs tissus spécifiques du ver *E. andrei* après une exposition au Plomb et au HMX et s'il existe des relations entre cette possible accumulation de MTLPs et l'altération de la reproduction des vers exposés au Pb et HMX.

De façon plus spécifique, notre étude doit permettre de bâtir une base de données écotoxicologiques des effets du Cd, du Pb et du HMX en sol sablonneux de type militaire sur la reproduction du ver *E. andrei* (dans le cadre du projet DND du CNRC-IRB). Il s'agira aussi de tester la nouvelle méthode de mesure des MTLPs dans des homogénats de ver *E. andrei* par HPLC (Ndayibagira *et al.*, 2007), notamment au niveau de sa reproductibilité et de sa spécificité, d'en découvrir les points faibles et les points forts.

Le Cd a été sélectionné car il s'agit d'un toxique de référence très utilisé pour l'analyse de la MT. Cela nous permettra de juger de l'efficacité de notre méthode par rapport aux autres méthodes utilisées dans la littérature. Le Pb a quant à lui été sélectionné car c'est aussi un métal bivalent et on devrait s'attendre à observer une réponse des MTLPs. Toutefois, ce métal n'a que peu ou pas été utilisé lors d'études sur les MTs. Le HMX est une substance énergétique très présente sur les sites militaires contaminés et il existe beaucoup d'études intra laboratoire à son sujet, ce qui en fait un modèle de toxicité pour les ME.

1.6 Design expérimental de l'étude

1.6.1 Test de reproduction

Le test de reproduction utilisant le ver de terre de l'espèce *E. andrei* est réalisé selon les directives de l'OCDE et de l'ISO (OCDE, 1984; ISO, 1993; 1998)

1.6.1.1 Préparation des solutions de métaux/HMX et des milieux d'exposition RDDC

Les solutions aqueuses de CdCl_2 (Chlorure de Cadmium pentahydrate [CAS 7790-78-5] commandé chez Sigma-Aldrich [Milwaukee, WI, USA]) sont ajoutées à une quantité voulue de sol RDDC afin d'obtenir les concentrations nominales en sols 0, 2, 4, 8, 15, 30 mg Cd /kg sol sec. *Idem* pour les solutions aqueuses de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Nitrate de Plomb [CAS 10099-74-8], commandé chez Sigma-Aldrich [Milwaukee, WI, USA]) afin d'obtenir les concentrations nominales en sols 0, 25, 50, 100, 200, 500, 750, 1500 mg Pb /kg sol sec. Quant au HMX (1,3,5,7-tétranitroperhydro - 1,3,5,7-tétrazocine [CAS 2691-41-0] obtenu de Produits Chimiques Expro [Valleyfield, Quebec, Canada]), il est dilué dans de l'acétone et les solutions sont ajoutées à une quantité voulue de sol afin d'obtenir les concentrations nominales en sols 0, 0.15, 0.5, 1.5, 5, 15, 150 mg HMX /kg sol sec.

1.6.1.2 Préparation des sols RDDC contaminés

Le sol sablonneux utilisé dans cette étude est de type dit militaire (RDDC), une gracieuseté de DND et provenant de la Base militaire de Valcartier, Québec, Canada. L'eau zénopure est utilisée comme véhicule des sels de cadmium et de plomb pour amender les sols dans de grands plats en pyrex (environ >2kg sol poids sec), alors que dans le cas du HMX, c'est l'acétone qui est utilisée. Après un court mélange manuel avec une spatule, les sols amendés sont distribués dans de grands

pots en téflon (environ >1kg sol poids sec) en vue d'une plus grande période de mélange (18h en mélangeur rotatif). Par la suite, les sols sont replacés dans leurs plats en pyrex respectifs et il s'ensuit une période d'équilibre de 48h pour les sols contaminés au Cd et au Pb. Dans le cas du HMX, une période d'évaporation de 14 jours sous une hotte et à la noirceur (photosensibilité du HMX) est nécessaire afin d'enlever les dernières traces d'acétone. Enfin, les sols sont distribués dans des pots de verre Mason (500g sol poids sec, n=4) puis de l'eau zénopure est utilisée pour obtenir une humidité relative de 12-15% (75% de la WHC [Water Holding Capacity]) pour conduire les tests.

1.6.1.3 Préparation du ver bio indicateur à partir des cultures

Les oligochètes *E. andrei* obtenus de la firme commerciale Carolina Biological Supply (Burlington, NC, USA) sont utilisés pour établir les cultures de laboratoires. Les animaux sont maintenus dans une litière spécialement conçu pour les vers de terre ou "bedding" (Magic Products, Amherst Jct, WI, USA) et sont nourris deux fois par semaine avec des céréales crues séchées (Magic Worm Food, Magic Products, Amherst Jct, WI, USA). La température est maintenue à $20 \pm 1^\circ\text{C}$, l'humidité à $75 \pm 5\%$ et le cycle jour/nuit est de 16 heures de lumière pour 8 heures d'obscurité. Ils peuvent ainsi se multiplier et augmenter la biomasse nécessaire aux expériences dans les meilleures conditions.

Aux fins de standardisation, des vers matures (présence d'un clitellum bien développé, figure 1.12) sont sélectionnés sur la base du poids qui doit être compris entre 300mg et 600mg. Avant d'exposer les vers à un milieu contaminé, on alloue une période de purge de 24h afin d'enlever toute trace du milieu de culture et de nourriture du système digestif des vers. Cette purge s'effectue en plaçant les vers sur du papier Whatman #4 humide dans des boîtes de Pétri pendant 24h hors de toute source de lumière (les boîtes de Pétri seront recouvertes de papier d'aluminium). Vient ensuite une période d'acclimatation des vers au sol RDDC sain

en pot Mason de 1L pendant 48h. Une nouvelle purge de 24h permet de se débarrasser des résidus de sol RDDC sain dans le système digestif des vers avant leur pesée individuelle initiale. Les vers matures, acclimatés et pesés sont alors prêts pour l'exposition à des concentrations croissantes de métaux lourds ou de HMX dans les pots Mason 1L contenant 500g de sol RDDC (poids sec), à raison de 10 vers adultes par pot et par concentration.



Figure 1.12. Ver *Eisenia andrei* adulte et mature (présence d'un clitellum bien développé).

1.6.1.4 Déroulement du test de reproduction

Le test de reproduction se déroule dans des conditions optimales en incubateur : la température doit être maintenue à $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ et le cycle jour/nuit est de 18h/6h (figure 1.13). Au début du test, l'humidité dans les pots Mason est ajustée à $75\% \pm 5\%$ de la WHC pour avoir une humidité relative de 12-15%. L'humidité est contrôlée chaque semaine en comparant le poids des pots Mason à leur poids initial, et en ajoutant de l'eau zénopure si nécessaire. Les vers sont nourris toutes les semaines en versant dans chaque pot 2 g de céréales crues séchées. Au 28^{ème} jour, les vers survivants à l'exposition sont comptés, purgés puis pesés (poids final) et congelés. Afin d'avoir un accès facile aux segments contenant les gonades et ceux formant le clitellum, les vers *E. andrei* adultes sont enroulés dans toute leur longueur

dans du papier d'aluminium puis congelés dans la glace carbonique. Au moment opportun, les vers seront disséqués en segments, et homogénéisés en vue de la détermination des MTLPs dans les tissus (voir §1.6.4.1). À ces observations s'ajoutera une base de données sur les paramètres de reproduction, soit la mortalité et la croissance des vers.

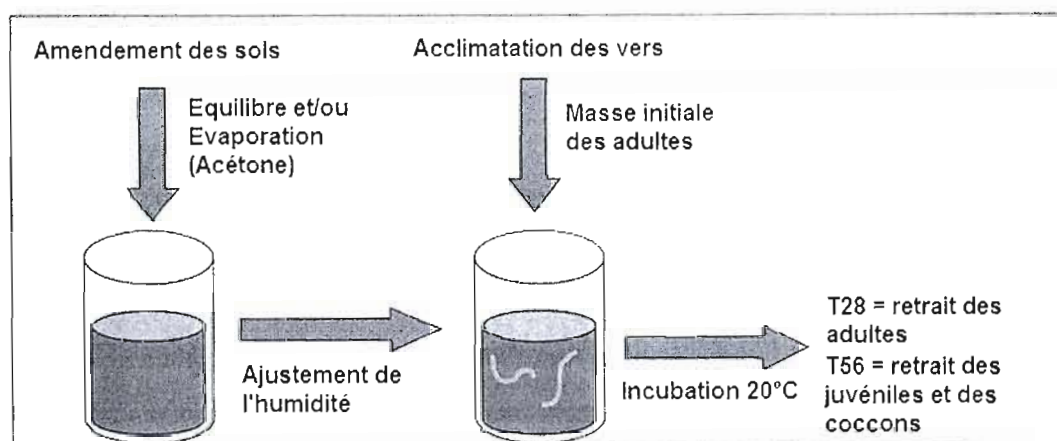


Figure 1.13. Schéma du design expérimental : déroulement du test de reproduction.

Après la collecte et la congélation des adultes, les sols et tout leur contenu sont remis dans leurs pots Mason respectifs et ceux-ci sont replacés dans les incubateurs pour 4 autres semaines. Ce laps de temps permet l'éclosion des cocons présents dans les sols. Pendant cette période, les juvéniles sont nourris avec 1 g de céréales crues séchées, chaque semaine. Au 56^{ème} jour les cocons éclos, les cocons non éclos (figure 1.15) et les juvéniles (figure 1.14) sont collectés, dénombrés et pesés. Le montage illustré ci dessous (figure 1.16) permet de récupérer facilement les juvéniles puis les cocons éclos et non éclos. Brièvement, les pots Mason 1L contenant les sols sont plongés dans un bain marie à 50-55 °C. A cette température, les juvéniles tentent de fuir la chaleur et migrent rapidement à la surface du sol ; ils sont alors facilement récupérables à l'aide de pinces plates. Pour récupérer les cocons éclos et les cocons non éclos, les sols sont passés à travers des tamis successifs sous un jet d'eau. Les cocons ainsi récupérés sont alors

séparés en deux catégories en les plongeant dans un récipient d'eau : les coquilles des cocons éclos plus légères flottent à la surface de l'eau tandis que les cocons non-éclos coulent au fond du récipient. Ces observations constitueront la base de données sur les paramètres de reproduction, soit le nombre de juvéniles produits ainsi que leur poids (production de biomasse), le nombre de cocons éclos/non éclos produits ainsi que leur poids (production de biomasse) et le taux d'éclosion.

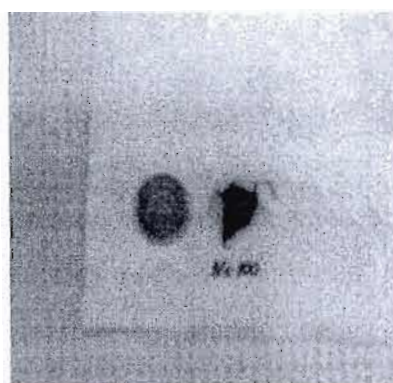


Figure 1.14. Vers *Eisenia andrei* juvéniles.

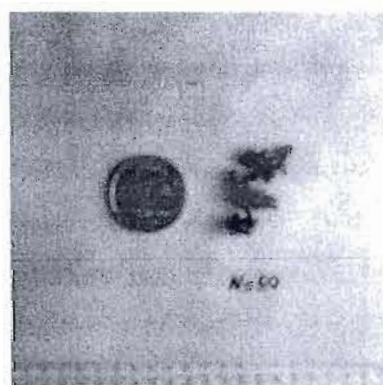


Figure 1.15. Cocons éclos/non éclos du ver *Eisenia andrei*.



Figure 1.16. Montage permettant la collecte des juvéniles et des cocons.

1.6.2 Contrôle de la contamination

1.6.2.1 Généralités

Les contenus en Cd et en Pb dans les sols et les tissus de vers sont déterminés par spectrométrie de masse – torche au plasma ("inductively coupled plasma optical - mass spectroscopy" ou ICP-MS). Les limites de détection de cette méthode pour les mesures des contenus en Cd et en Pb sont respectivement de 0.5 mg Cd /kg et de 10mg Pb /kg. Les concentrations en HMX dans les solutions d'amendement, dans les sols et dans les tissus de ver sont déterminées par chromatographie liquide haute performance (HPLC) tel que décrit par l'Agence de Protection de l'Environnement des États-Unis (Method 8330 - USEPA, 1997). Brièvement et dans le cas du HMX dans les solutions d'amendement, un aliquot des solutions est mélangé avant l'analyse HLPC avec de l'acétonitrile (1:9, v/v) puis avec de l'eau désionisée (1:1, v/v). Il est important que la vaisselle de laboratoire utilisée lors de ces manipulations soit prélavée dans un bain d'acide et rincée avec de l'eau

zénopure, ceci afin de supprimer toute trace de poussières, de sol ou autres particules qui pourrait interférer avec les résultats.

1.6.2.2 Concentration en produits toxiques dans les sols

Les concentrations en métaux sont mesurées dans des échantillons de sols prélevés au début (T=0), au milieu (T=28) et à la fin (T=56) de l'exposition. La détermination du contenu en métal dans les échantillons de sols (minimum de 0.5g poids sec) est réalisée avec des échantillons secs (105°C pendant 24h). Par la suite, les échantillons secs sont refroidis en dessiccateur, pesés et réduits en une fine poudre avec un mortier et un pilon. La détermination des métaux dans les échantillons de sol passent tout d'abord par une étape de digestion à l'acide (CEAEQ, 2003b), réalisée au laboratoire, puis les produits de digestion sont envoyés au CEAEQ, où ils seront soumis à une spectrométrie de masse à source ionisante au plasma d'argon (ICP-MS), selon leur méthode standardisée (CEAEQ, 2003b). La validation des analyses des métaux est réalisée avec des sols de référence (TILL-1, TILL-2, TILL-3 and TILL-4) obtenus du Projet Canadien des matériaux de référence certifiés (Canadian Certified Reference Materials Project - CCRMP, CANMET Mining and Mineral Sciences Laboratories, 555 Booth Street, Ottawa, Canada). Le HMX est extrait des échantillons de sols prélevés au début (T=0), au milieu (T=28) et à la fin (T=56) de l'exposition conformément à la méthode 8330 de l'USEPA (USEPA, 1997). Brièvement, 10ml d'acétonitrile sont ajoutés à un échantillon de sol pesé (2g poids sec) puis mélangés au vortex pendant 1 minute. La préparation est par la suite passée au Ultrasons (60Hz) pendant 18 ± 2 h à 20°C. Ensuite 5ml du surnageant de la préparation sont mélangés à 5ml d'une solution aqueuse de CaCl (5mg/L) dans un flacon de 20ml, puis cette solution est filtrée a travers une membrane Millipore® de polytétrafluoroéthylène (Ø 45mm). Le premier ml est jeté, puis le reste de la solution est analysée par HPLC (Robidoux *et al.*, 2001, 2002). La limite de détection instrumental pour le HMX étant de 34 µg /L, la limite de quantification du HMX dans les sols est donc de 0.29 mg /kg (poids sec). Le 2,4DNT (2,4 dinitrotoluène) est utilisé par le groupe de chimie analytique comme standard interne pour évaluer la

récupération des composés énergétiques et valider les mesures de HMX dans les échantillons de sol.

1.6.2.3 Concentration en produits toxiques dans les tissus

Lors du 28^{eme} jour du test de reproduction, 4 des 10 vers adultes collectés sont congelés en vue des analyses chimiques. La détermination du contenu en métal dans les matrices biologiques (minimum de 0.1g poids sec) est réalisée en utilisant des échantillons secs et lyophilisés. Si nécessaire, les échantillons sont réduits en poudre avec un mortier et un pilon. La détermination des métaux dans les tissus animaux passent aussi par une étape de minéralisation acide (CEAEQ, 2003a), réalisée au laboratoire, puis les produits de digestion sont conservé à 4°C et envoyés au CEAEQ, où ils seront soumis à une spectrométrie d'émission au plasma d'argon (ICP-ES), selon leur méthode standardisée (CEAEQ, 2003a). La validation des analyses des métaux est réalisée avec des tissus standard (DORM-2, DOLT-3 and TORT-2) obtenus du Conseil national de recherche canadien – Institut des étalons nationaux de mesure (National Research Council - Institute for National Measurement Standards - NRC-INMS, M-12, 1500 Montreal Road, Ottawa, Ontario, Canada, K1A 0R6). Les concentrations en HMX dans les matrices biologiques sont déterminées après exposition des vers en utilisant la même méthode que pour la détermination du contenu en HMX dans les sols, conformément à la méthode 8330 de l'USEPA (USEPA, 1997). La limite de détection de cette méthode est de 0.97 µg HMX/g de tissus. Le 2,4DNT (2,4 dinitrotoluène) est généralement aussi utilisé par le groupe de chimie analytique comme standard interne pour évaluer la récupération des composés énergétiques et valider les mesures de HMX dans les tissus animaux.

1.6.3 Quantification des MTLPs

1.6.3.1 Segmentation des vers

Au 28^{ème} jour du test de reproduction, 4 des 10 vers adultes collectés sont congelés tel qu'indiqué au paragraphe 1.6.2.4. Les vers sont par la suite découpés, selon le schéma de la figure 1.17, en 3 catégories de tissus, soit les gonades (segments 9 à 15), le clitellum (segments 32 à 37) et le tissu de type non-reproductif ou NR (autres segments qui ne sont pas impliqués dans la reproduction). Les tissus individuels ainsi séparés sont ensuite regroupés par catégorie pour l'homogénéisation. Compte tenu des 4 vers utilisés pour les analyses chimiques et des 4 vers utilisés pour la segmentation, il ne restait que 2 des 10 vers du 28^{ème} jour. Ces deux derniers vers ont été conservés pour d'éventuels tests d'activités enzymatiques (SOD, Catalase et/ou GSH). Malheureusement ces tests n'ont pu être réalisés faute de temps et de moyens.

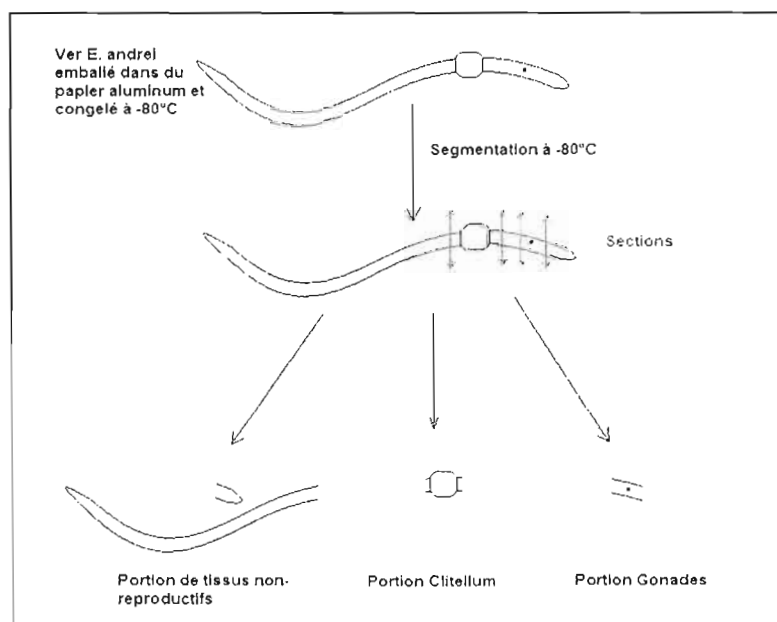


Figure 1.17. Étapes de segmentation menant aux portions contenant les gonades et le clitellum du ver *E. andrei*.

1.6.3.2 Homogénéisation des tissus de ver

La méthodologie décrite ci-dessous (homogénéisation des vers) est celle utilisée par le personnel de l'IRB-CNRC et a été décrite par Ndayibagira *et al.* (2007). Le tampon d'homogénéisation des tissus de vers en vue de l'extraction des MTLPs (concentration finale : 150mM KCl, 50µM Ap et 5µM Pep A.) est un mélange d'antiprotéinases (Antipain hypochloride [CAS 37691-11-5], et Pepstatin A [CAS 26305-03-3]) en solution hypotonique (Chlorure de potassium, KCL [CAS 7447-40-7]). Ces trois produits sont fournis par SIGMA. Ces antiprotéinases étant livrées sous forme cristalline, on réalise des solutions de réserve que l'on conserve à -20°C. La Pepstatine A (Formule moléculaire $C_{34}H_{63}N_5O_9$, Masse moléculaire 685.892) est un puissant inhibiteur des protéases aspartyl. C'est un hexapeptide contenant l'acide aminée inhabituel Statine (Sta, acide (3S,4S)-4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanoïque). La pepstatine A a été isolée une première fois à partir d'une culture contenant plusieurs souches d'*Actinomyces* (Umezawa *et al.*, 1970). Marciniszyn *et al.*, 1976 ont tout d'abord remarqué cette protéine pour son habilité à inhiber la pepsine à de très faibles concentrations (de l'ordre du picomol). Puis il a été découvert par la suite que la pepstatine possédait un grand potentiel d'inhibition envers la plupart des protéases acides et donc qu'elle pouvait devenir un outil de recherche de grande valeur, notamment comme constituant récurrent des cocktails inhibiteur de protéases. La pepstatine A est insoluble dans le méthanol ou le DMSO, et est très peu soluble dans l'eau. Toutefois, elle peut être dissoute jusqu'à 1mg/ml dans un mélange 10% acide acétique – méthanol. L'antipain est un oligopeptide (Peptidyl arginine aldéhyde), produit par *Actinomycetes* et d'autres bactéries, et qui agit comme un inhibiteur de protéase, particulièrement comme un inhibiteur des endopeptidases dépendantes du Ca^{2+} (sérine protéases similaire à la trypsine, papaïne, cathepsine A/B, quelques cystéine protéases). Cette spécificité de l'antipain est similaire à la leupeptine. L'antipain est toutefois plus spécifique pour inhiber la papaïne et la trypsine que ne l'est la leupeptine. La concentration effective de l'antipain est de 1-100 mM.

Par la suite, les vers adultes entier ou les segments (voir §1.6.3.1) sont homogénéisés dans le tampon d'homogénéisation (1:5, W/V) avec un homogénéiseur en verre Wheaton 7ml. Les échantillons (homogénats) sont répartis en aliquots (200µl), congelés et conservés à -80°C en vue de la réaction de dérivation.

1.6.3.3 Réaction de dérivation

Toutes les solutions sont préparées avec de l'eau zénopure pourvue par l'appareil Super Q (Waters Technologies) du laboratoire d'Écotoxicologie de l'IRB. La méthodologie décrite ci-dessous (réaction de dérivation) est celle utilisée par le personnel de l'IRB-CNRC et a été décrite par Ndayibagira *et al.* (2007).

La solution-tampon pour la réaction de dérivation est un mélange alcalin (pH 10.5) et chélateur d'EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique, CAS 638-92-6), d'acide borique (CAS 10043-53-3) et de KOH (Hydroxyde de potassium, CAS 1310-58-3) obtenus de la compagnie SIGMA. La concentration finale est : acide borique 1M, EDTA 30 mM et KOH 0.8 M. La solution tampon est conservé à 4°C. La réaction (figure 1.18) se produit avec l'addition du fluorochrome SBD-F (7-Fluorobenzofurazan-4 sulfonic acid ammonium salt, CAS 84806-27-9) et du réducteur non-thiolé TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphine, CAS 51805-45-9). Ces deux produits peuvent être obtenus chez la compagnie SIGMA. Étant livrés sous forme cristalline, on réalise des solutions de réserve (SBD-F 0.5% (W/V) et TCEP 112mM) que l'on conserve à 4°C et à la noirceur.

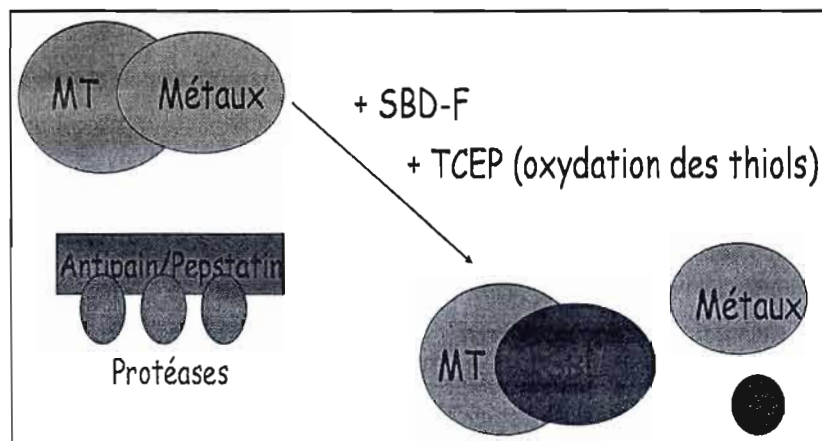


Figure 1.18. Réaction de dérivation entre la MT et le fluorochrome SBD-F.

La réaction de dérivation comporte des étapes de chauffage, de centrifugation et de purification, telle que décrite par Ndayibagira *et al.*, 2007. Lors de la réaction (figure 1.18), les fonctions thiols des MTLPs sont oxydées par le TCEP, libérant ainsi les métaux liés et permettant la liaison avec le SBD-F. Ainsi, le SBD-F se sépare de son atome de fluor et se lie aux fonctions -SH oxydés des MTLPs. Il reste en fin de réaction le complexe SBD-MTLP que l'on quantifiera par HPLC, ainsi que le fluor et les métaux libérés.

La métallothionéine-I de foie de lapin obtenue chez la compagnie SIGMA (CAS 73767-19-5) est utilisée afin de réaliser une courbe étalon de MT. Cette MT du commerce est testée par spectrophotométrie pour sa stabilité et sa pureté à chaque utilisation pour une courbe de calibration. En effet, la MT-I est rapidement altérée par les UVs, la chaleur et se dégrade avec le temps. Sous forme cristalline à l'achat, la MT-I est diluée dans de l'eau zénopure à une concentration de 2mg/ml, soit 1 mg de MT-I sous forme solide cristalline dans 0.5 ml d'eau zénopure. Un ajustement sera nécessaire si la concentration en MT n'est pas de 2mg/ml. On utilise l'équation suivante afin d'avoir la concentration exacte dans le flacon de MT-I :

$$C = 100 \cdot (A / \epsilon \cdot l) \cdot MT.M.W.$$

Où C représente la concentration en mg/ml,
 100 le facteur de dilution de la solution testée,
 A l'absorbance donnée par le spectrophotomètre,
 ϵ le coefficient d'extinction molaire,
 l la longueur en cm de la cuvette du spectrophotomètre (1cm généralement),
 et MT.M.W. la masse moléculaire de la métallothionéine.

La quantité de MTLPs dans l'échantillon injecté est déterminée en utilisant une courbe standard réalisée après dérivation par le SBD-F de quantités connues de MT-1 de lapin, selon la méthode de Ndayibagira *et al.*, 2007. Suite à la collecte de données effectuée par le programme Empower®, on peut alors tracer la courbe étalon à partir des aires sous les pics de MT. La phase mobile utilisée est une solution de K_2HPO_4 (CAS 7758-11-4) 20mM, d' Acétonitrile "low water" (JT Baker, CAS 75-05-8) et de Méthanol HPLC (JT Baker, CAS 67-56-1). Les proportions K_2HPO_4 : ACN : MeOH sont 80:18:2. La circulation de la phase mobile dans le système HPLC est réglée à 0.7ml/min. L'élution est en mode isocratique. Une solution de MeOH et d'eau Ultrapure (HPLC grade) (50 :50) est utilisée pour rincer la seringue entre chaque injection d'échantillon. Le système HPLC est équipé d'un échantillonneur automatique Waters 717plus, d'une pompe et d'un contrôleur Waters 600, d'un détecteur a photodiode Waters 2996. Un module de contrôle de température couplé à une colonne C18 de Supelco et un collecteur de déchets complètent le système. Au terme des analyses, tous les échantillons testés sont détruits avec de l'eau de javel et jetés à l'égoût ou déposés dans une poubelle pour déchets biologique, le cas échéant. Le sérum d'albumine bovine (BSA, CAS 9048-46-8) et le réactif de Bradford obtenus chez Sigma sont utilisés pour la mesure des protéines totales dans les homogénats de vers. Le contenu en protéines dans les homogénats est déterminé par la méthode de Bradford (Bradford, 1976) dans des plaques de 96 puits. L'essai est réalisé sur les homogénats "bruts" sans traitement à la chaleur (le facteur de dilution dans le tampon d'homogénéisation est alors de 1 :10) et sur les surnageants traités à la chaleur (pas de facteur de dilution) tel que

décrit par Ndayibagira *et al.* (2007). L'absorbance à 595nm des échantillons sur la plaque 96 puits est lue 5 min après l'addition du réactif de Bradford. Le BSA 2mg/ml est utilisé en dilutions successives pour préparer la courbe étalon. Les données (temps de rétention, aire du pic de MTLPs pour chaque échantillon) sont collectées par le logiciel Empower® puis transformés en concentrations exprimées en μg de protéines par ml d'homogénats puis en μg de protéines par g de tissus grâce à la courbe étalon de MT.

1.6.4 Analyses statistiques

1.6.4.1 Paramètres de toxicité

Les paramètres de toxicité tels que la CE_{20} , la CE_{50} , CL_{50} , la CME0 (LOEC en anglais) et la CSEO (NOEC en anglais) sont utilisés en écotoxicologue à des fins de normalisation et de comparaison. Ces données servent à mesurer le pouvoir toxique d'un produit : ce sont des indicateurs quantitatifs de la toxicité d'une substance et elles permettent d'établir des classes de toxicité. La CE_{20} et La CE_{50} sont les doses de substance effectives pour causer 20% et 50% d'effet chez une population animale donnée, respectivement, et dans des conditions d'expérimentation précises. La CL_{50} est la dose de substance causant la mort de 50 % d'une population animale donnée dans des conditions d'expérimentation précises. La CME0 est la dose de substance provoquant le plus petit effet visible chez une population animale donnée dans des conditions d'expérimentation précises. La CSEO est la plus grande dose de substance ne provoquant aucun effet visible chez population animale donnée dans des conditions d'expérimentation précises. Ces valeurs s'expriment en milligrammes de matière active par gramme ou kilogramme. Plus ces chiffres sont petits, plus la substance est toxique. Ces doses ne sont valables que pour une espèce précise et un mode d'introduction précis dans l'organisme (ingestion, inhalation, application cutanée). Autour de 50 % d'effet, de toutes petites variations de dose peuvent donner de grandes variations dans le

pourcentage d'animaux touchés, ce qui a fait retenir cette valeur de 50% comme valeur clé. Ce concept permet de classer tous les produits par dangerosité à court et moyen termes. Lors de nos travaux, les paramètres de toxicité ont été déterminés avec le programme ToxCalc (version 5.0, Tidepool Scientific Software, McKinleyville, CA). Les CE_{20} , CE_{50} et LC_{50} sont déterminées par interpolation linéaire tandis que la CSEO et la CMEQ sont déterminées par un Steel's Many - one rank test.

1.6.4.2 Tests statistiques

Le programme JMP IN (version 4.04, SAS Institute Inc.) a été utilisé afin d'appliquer un Student T-test et une ANOVA après avoir préalablement testé l'homoscédasticité des groupes de variance et la normalité des résidus, et ce pour chaque set de données. Dans le cas où les résidus des données obtenues auront une distribution normale et homogène, des tests paramétriques de comparaisons multiples ont été réalisés dans le but de détecter les traitements entraînant des différences significatives comparativement au témoin solvant (Dunnett's; $p > 0,05$) ou aux autres traitements (Tukey-Kramer; $p > 0,05$). Des tests non paramétriques ont plutôt été réalisés lorsque les données obtenues n'offraient pas de distribution normale, comme le test de Wilcoxon (vérification si deux échantillons peuvent être issus de la même loi, équivalent au test de Mann-Whitney), le test de Kruskal-Wallis (comparaisons multiples entre les conditions expérimentales) et le test de Mann-Whitney. Les concentrations en Cd, Pb et HMX dans les tissus de vers et dans les sols sont exprimées en valeurs moyennes \pm erreurs standard ($n=4$ groupes de 4 vers/échantillons de sols par traitement). Les autres résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm l'écart-type ($n=4$ répliques par traitement).

1.6.4.3 Régressions et Corrélations

Lorsqu'une corrélation entre deux variables est suspectée, les données sont soumises à une analyse de régression en utilisant la méthode des moindres carrés.

Cette méthode a souvent été utilisée par le passé afin d'établir des corrélations entre l'induction de MT et l'accumulation de Cd dans les tissus de nombreuses espèces (*i.e.* Olsson et Haux, 1986; Campbell *et al.*, 1990; Perceval *et al.*, 2002) ainsi qu'entre l'induction de MT et certains paramètres physiologiques comme la reproduction et la croissance (Gillis *et al.*, 2002). Dans la présente étude, l'approche statistique prévoit des analyses de corrélation entre les concentrations de MTLPs, les paramètres de cycle de vie du ver et les concentrations en produits toxiques.

1.6.4.4 L'analyse en composantes principales

Les analyses de régression ont été par la suite complémentées et confirmées par une analyse statistique multivariée. L'analyse factorielle utilisant l'approche des composantes principales est généralement employée pour deux buts: le premier concerne l'évaluation des interrelations entre les diverses variables (par exemple, si l'on veut savoir si l'expression de la MT dans la gonade est associée aux changements observés dans la reproduction ou à la présence de contaminant); le deuxième concerne la réduction des données dans un espace géométrique afin d'identifier la ou les composantes principales qui expliquerait l'ensemble de la variance observée (par exemple, pour savoir quelle a été la réponse la plus dominante (le biomarqueur ayant un poids factoriel importante dans une des composantes principales) chez les vers exposés au Cd, au Pb puis au HMX). Dans cette étude, l'ACP est réalisée sur les données standardisées de 11 variables : avec les 4 mesures des [MTLPs], soit dans les trois différents tissus et les MTLPs totales, avec les 5 paramètres du cycle de vie de *E. andrei*, plus la croissance, et enfin les concentrations en produit toxique dans les sols et les tissus. Ainsi, cet outil statistique nous permet d'observer facilement des relations étroites qui pourraient nous renseigner sur la signification physiologique d'une accumulation de MTLPs chez le ver de terre.

CHAPITRE II

Effets d'un sol sablonneux amendé au cadmium sur la reproduction et l'accumulation de protéines de type métallothionéine du ver de terre *E. andrei*.

Ce chapitre a été soumis à la revue *Chemosphere* sous le titre suivant :

Effects of cadmium-spiked sandy soil on earthworm *Eisenia andrei* reproduction and metallothionein-like protein accumulation.

Blanchard M.^{1,2}, Bérubé V.^{1,2}, Ndayibagira A.³, Trottier B.², Robidoux P.Y.^{1,2*}

¹ Applied Ecotoxicology Group, Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada, 6100 Royalmount Av., Montreal, Quebec, Canada, H4P 2R2

² Research Center for Environmental Toxicology (TOXEN), Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8

³ Health Canada, Reduced Risk Section, 2720 Riverside Drive, Ottawa, Ontario, Canada, K1A 0K9

2.1 Abstract

This study investigates the relationship between metallothionein-like protein (MTLP) accumulation in reproductive tissue and the decrease in reproduction in *Eisenia andrei* following cadmium exposure. Adult earthworms were exposed 28 days in Cd-spiked soil. Cocoons and juveniles were collected after 56 days of exposure. Determination of MTLP concentrations in adult tissues were performed by HPLC detection using an isocratic solvent. Results show that Cd soil concentrations (ranging from 2.6 and 22.4 mg/kg soil d.w.) cause a significant decrease of cocoon, juvenile production or a loss of weight. Exposure to sublethal Cd concentrations also leads to increased levels of MTLPs in total organism. Upon body segmentation (gonads, clitellum and non-reproduction-related tissue), significant MTLP accumulation was observed in gonad and non-reproductive portions, confirming the role of MTLP to bind Cd in order to protect earthworm from the metal toxicity. Significant correlations were observed between the major reproduction parameters (cocoon and juvenile production after 56 days) and MTLP levels in earthworm tissues, suggesting a relationship between an increase of MTLP concentrations and reproduction impairment. With the MTLP detoxification mechanism, reproduction is allowed at low sublethal Cd concentration while reproduction is compromised at higher Cd concentrations.

Keywords: Cadmium; Metallothionein-like proteins; Reproduction; Earthworms; Segmentation; Military soils;

2.2 Introduction

Sentinel species are useful in soil and water pollution studies. Earthworms and *E. andrei* particularly are more susceptible to metal pollution than many other groups of soil invertebrates (Bengtsson *et al.*, 1992). This species accumulate high concentrations of metals from contaminated soil (Ireland, 1975; Martin and Coughtrey, 1975; Morgan and Morgan, 1988) and, considering their relative sensitivity, toxicity data from earthworms are important in determining safe levels for metals in soil (Spurgeon and Hopkin, 1996). *Eisenia sp.* is particularly recognized as a suitable and standard biomonitoring tool to assess the effect of metals and reveal the potential pollution impact on ecosystems (OECD, 1984; USEPA, 1989; ISO, 1993; 1998). Effectively, metal-contaminated soils affect the density and viability of earthworms (Bengtsson *et al.*, 1983) as well as their growth and sexual development, including cocoon production (Spurgeon *et al.*, 1994; Spurgeon and Hopkin, 1996).

The soil contamination is a major issue for Canadian Forces, which extensively use range and training areas (RTA) for military training. The soil of these sites has been shown to be contaminated by heavy metals (*i.e.* Cd and Pb) and by energetic materials (*i.e.* HMX) (Robidoux *et al.*, 2000; 2002; Berthelot *et al.* 2008a, 2008b, 2009). In previous studies dealing with soil contamination by energetic substances, Robidoux *et al.* (2004a) and Thiboutot *et al.*, (2004) have suggested that metals coming from military weapons, projectile cases and targets used for training may have contributed to the soil toxicity. Cadmium soil concentration of Canadian RTA may particularly reach 26-31 mg Cd /kg soil d.w. in "hotspots" in front of a training targets (Robidoux *et al.*, 2000; Robidoux *et al.*, 2004b), 33.9 mg Cd /kg soil d.w. in "hotspots" in front of firing position (Marois *et al.*, 2004) and a astonishing maximum of 4550 mg Cd /kg soil d.w. near propellant burning pads (Thiboutot *et al.*, 2004). The concentrations of Cd on these site generally exceeds the CCME Agricultural Soil Quality Guideline (SQG) and, in some cases, the CCME Industrial

SQG (22 mg/kg; Robidoux *et al.*, 2000, CCME 2006; Marois *et al.*, 2004; Ampleman *et al.*, 2004). Ecological criteria have been established for those types of contaminants for their effects on soil and on terrestrial fauna (Lachance *et al.*, 2008; Robidoux *et al.*, 2006; 2008). Then the impact of military training of Canadian forces and its sustainability can easily be considered (Lachance *et al.*, 2008; Robidoux *et al.*, 2006; 2008).

Cd is very toxic and has particularly harmful effects on organisms (CEPA, 1994). Cd is effectively lethal to earthworms and it particularly affects earthworms growth and reproduction (Van Gestel *et al.*, 1991; 1992; Spurgeon *et al.*, 1994). Malecki *et al.* (1982) found an EC₅₀ of 50 mg Cd / kg soil (d.w.) for cocoon production in a natural soil, while Spurgeon *et al.* (1994) observed more recently a similar EC₅₀ (46.3 mg Cd/kg soil, d.w.) for cocoon production in artificial soil. Reduction of cocoons production has been observed at ≥ 10 mg Cd/kg (d.w.) in artificial soil (Van Gestel *et al.*, 1992). Explaining those results on reproduction, it has been demonstrated that the Cd toxicity is gonadal-specific, targeting mice and humans testis (Klaassen, 1995; Waalkes and Klaassen 1985) and ovaries of earthworm *Dendrobaena veneta* (Siekerska and Urbanska-Jasik 2002). Cadmium is highly toxic in natural sandy soil with low organic content (high bioavailability; USEPA, 2005; Berthelot *et al.*, 2008a), and less toxic in artificial or forest soil with high organic content (low bioavailability; Van Gestel *et al.*, 1991; 1992; Spurgeon *et al.*, 1994). Indeed, Cd has a LC₅₀ of 320-560 mg/kg in sandy soil and a LC₅₀ > 1000 mg/kg (dry weight; d.w.) in artificial OECD soil (Van Gestel and Van Dis, 1988). Soil parameters and bioavailability are effectively known to modulate responses of terrestrial invertebrates to metals toxicity (Lanno *et al.*, 2004; Berthelot *et al.*, 2008a).

In earthworms, two coexisting intracellular pathways are responsible for metal accumulation. The first involves retention of metals (particularly Pb) in insoluble phosphate granules called chloragosomes (Morgan and Morris, 1982; Morgan and

Morgan, 1988). The second pathway is the intervention of sulfur-rich ligands like metallothionein-like proteins (MTLP) able to bind metals (particularly Cd) within cadmosomes (Suzuki *et al.*, 1980; Yamamura *et al.*, 1981; Morgan and Morgan, 1990; Morgan *et al.*, 1993). Since MTs are proteins physiologically involved in essential metal ions transport and regulation, and function as intracellular distributors of copper and zinc, they also play a role in non-essential metal regulation and detoxication (Bremner and Beatie, 1990; Roesijadi, 1994b; Klaassen, 1995; Klaassen *et al.*, 1999). They are particularly known to protect cells from Cd toxicity and oxidative stress (Klaassen 1995; Klaassen *et al.*, 1999; Andrews 2000; Kwang *et al.*, 2008). Metallothionein are induced by metals in earthworms (Suzuki *et al.*, 1980; Yamamura *et al.*, 1981; Furst and Nguyen, 1989) and has been well identified and characterized in several earthworm species (Stürzenbaum *et al.*, 1998; Gruber *et al.*, 2000). It has also been demonstrated that MT induction by Cd was time- and dose-dependent in these terrestrial invertebrates (Stürzenbaum *et al.*, 2001; Ndayibagira *et al.*, 2007). MT gene expression was also induced after Cd exposure in earthworms *Lumbricus rubellus* (Galay-Burgos *et al.*, 2003), *L. terrestris* (Spurgeon *et al.*, 2004) and *Eisenia foetida* (Demuyne *et al.*, 2006), while Ndayibagira *et al.* (2007) observed MTLP induction in *E. andrei*. Their results revealed a clear relationship between the intensity of Cd exposure and the MT induction in worms.

Biomarkers can be used as early warning indicators of environmental contamination and potential adverse effects on populations (Peakall 1994). Some researchers have suggested measuring MTs or MTLPs (gene expression or protein induction) in environmentally relevant organisms to monitor soil and water pollution and to assess animal exposure (Scott-Fordsman and Weeks, 2000; Kammenga *et al.*, 2000; Galay-Burgos *et al.*, 2003; Ndayibagira *et al.*, 2007). MTLP content in earthworms tissue was considered as a potential biomarker of Cd exposure (Scott-Fordsman and Weeks, 2000; Kammenga *et al.*, 2000) but is now known as a sensitive and relevant biomarker of Cd exposure and useful in contaminated soil toxicity

assessment (Demuyne *et al.*, 2006; Ndayibagira *et al.*, 2007). The role of exposure biomarkers is to determine exposure of a class of contaminants and its reactivity to biochemical ligands. Usually, measurement of toxicants in target tissues confirms that exposure actually took place. But MTLP measures can confirm that not only exposure occurs but also that biochemical interactions took place. It has effectively been inferred that MTLP induction, while being a compensatory response to metal exposure, is an early indication of threat posed by metals to the earthworm (Ndayibagira *et al.*, 2007). Consequently, some researchers prefer to classify MT in early biological effect biomarkers, because its role was an initial reaction towards the presence of contaminants. Early induction of MTs as a defense mechanism, that is special case of early biological effects, is an adaptive and a defensive reaction (Gagné and Blaise, 2005).

This prompted us to perform a segmentation of the worm body into three separated portions (gonads, clitellum and non-reproductive tissues) to investigate relationships between MT mobilization and partitioning with reproduction effects under Cd exposure. Earthworm segments 9 to 15 include all the reproductive material: gonads, seminal vesicles and oviducts. Segments 32 to 37 are expanded in a clitellum, organ showing worm sexual maturity involved in cocoon secretion during egg-laying time. The objectives of the study were: 1) to use ecotoxicologically relevant endpoints (EREs) such as reproduction and weight changes to measure overall Cd toxicity in *E. andrei*, and 2) to investigate whether MTLP modulation in specific worm tissues could be associated with reproduction effects.

2.3 Materials and methods

2.3.1 Chemicals and reagents.

Cadmium (CdCl_2 pentahydrate; CAS 7790-78-5), Antipain hypochloride (CAS 37691-11-5), Pepstatin A (CAS 26305-03-3), SBD-F (7-Fluorobenzofurazan-4-sulfonic acid ammonium salt; CAS 84806-27-9) TCEP (Tris(2-carboxyethyl) phosphine; CAS 51805-45-9), EDTA salt (CAS 6381-92-6), Bovine Serum Albumin (BSA; CAS 9048-46-8), MT-I from rabbit liver (CAS 73767-16-5) and Bradford reagent were acquired from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA) and from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA). Deionized water was obtained using a Super Q water purification system (Millipore®) or Zenopure® Mega-90. Glassware was washed with phosphate-free detergent followed by rinses with water, acetone, nitric acid (10%, v/v) and deionized water, and then dried.

2.3.2 Earthworms.

The oligochaetes *E. andrei* were obtained from Carolina Biological Supply (Burlington, NC, USA) and were used to establish laboratory cultures. Animals were maintained in earthworm bedding (Magic Products, Amherst Jct, WI, USA) supplemented twice a week with dried and crude cereals (Magic Worm Food, Magic Products, Amherst Jct, WI, USA), at $20 \pm 1^\circ\text{C}$, with $75 \pm 5\%$ humidity and a light/dark cycle (16 hours light /8 hours dark)

2.3.3 Soil characteristics.

The soil was collected by Research and Development Defense Canada (Canadian Ministry of National Defense) at Valcartier military base (QC, Canada). Soil physical characteristics were: pH 4.4, 98 % sand, 1.7 % silt and 0.3 % clay, 0.30

% moisture and 0.02 % total organic carbon. Total concentrations of metals were low or not detected. The water-holding capacity (WHC; 25.1 mL/100 g) was determined by saturating the soil with water and measuring the water content (Robidoux *et al.*, 2001).

2.3.4 Soil amendment with Cadmium.

Deionized water was used as vehicle to spike soil with cadmium. Solutions were prepared to obtain the following nominal concentration in soil: 0, 2, 4, 8, 15, 30 mg/kg d.w. Soils were kept at 20°C for 14 days after spiking and before the beginning of the assays. Deionized water and Cd solutions were added to get 75 % of the soil water holding capacity (WHC). Soil samples were collected at days 0, 28, and 56 for cadmium analysis.

2.3.5 Exposure and measurements.

The effects of metal- and explosive-spiked soils on the growth and reproduction of *E. andrei* were assessed using the ISO method (ISO 1998). Mature worms (with well-developed clitellum) were selected (n=240), acclimated to clean sandy soil for 24h, and purged in Petri dishes from intestinal soil residues for further 24h. Then they were weighed and exposed at different concentrations of Cd-spiked sandy soil (500 g d.w.) in 1-litre Mason jars, in 4 replicates with 10 adults per jar and for each concentration. Humidity in jars was adjusted by adding deionized water if necessary (12-15 % humidity). Soil humidity was verified by weighing jars and worms were fed with 2 grams of dried cereals, every week and during 28 days. Surviving adult earthworms were then collected and purged during 24h, then weighted, spreaded and folded in aluminum foil in order to have access to gonads and clitellum segments and frozen in dry ice,. Three of the 10 worms were used for the body segmentation experiment. The worms were cut into three portions (gonads,

clitellum and non-reproduction-related tissue) and the segments were pooled by three and homogenized as described below. Four of the 7 remaining worms were used for chemical analysis of Cd. The three last worms were kept at -80 °C as an extra sample for additional analyses. After adult withdrawal (day 28), juveniles were fed with 1 gram of dried cereal every week while soil humidity was verified by weighing jars, for a further 28-day period. At day 56, the juveniles and cocoons were collected, counted and weighted.

2.3.6 MTLP derivatization and HPLC detection.

As described by Ndayibagira *et al.* (2007) total MTLP measurements were made with a reaction buffer containing 6,183 g boric acid, 1,673 g EDTA (45 mM) and 4,5 g KOH in 100 ml deionized H₂O, adjusted to pH 10.5 with 5M KOH, and kept at 4°C. The entire adult worms or the segmented compartments were homogenized with the reaction buffer in a ratio 1:5 (W/V) in a glass-glass homogenizer (Wheaton 7 ml) with (150 mM KCl, 50 µM Antipain and 5 µM Pepstatin A). Samples (200 µl aliquots) were stored at -80°C until HPLC analysis. Derivatization was performed as described in Ndayibagira *et al.* (2007). For the HPLC analysis, the mobile phase was (K₂HPO₄ 20 mM, pH 7.5, ACN (Trace metal grade), MeOH (Trace metal grade); 80:18:2). The HPLC System consisted of Waters Auto sampler 717plus, pump and controller 600, Waters Photodiode Array Detector 2996 and Temperature Control Module coupled to Supelco C18 column and waste collector build up. Initial solution of Metallothionein I from rabbit liver was tested for stability before being diluted and used for calibration curve. The following equation was used to calculate MT-I concentration in the vial: $C = D.F. * (O.D. / \epsilon.l) * MT.M.W.$, where C is the MT-I concentration in mg/ml, D.F. the dilution factor (1:100), O.D. the optic density given by the spectrophotometer, ϵ the molar extinction coefficient, l the quartz cuvette length (one cm across in this case) and MT.M.W. the molecular weight of the MT-I.

2.3.7 Protein content.

Protein content in homogenates was determined using Bradford Protein Assay (Bradford, 1976) in 96-well plates. The assay was performed on crude homogenate without heat treatment (dilution factor was 1:10) and on heat-treated supernatants (no dilution factor) according to Ndayibagira *et al* (2007). Absorbance at 595 nm was read 5 min after addition of the Bradford reagent. Bovine serum albumin (2 mg/ml) was used to prepare the standard curve.

2.3.8 Total MTLP.

Upon tissue segmentation, gonads, clitellum and non-reproductive tissue represent respectively 12 %, 15 % and 73 % of total body weight. The MTLP values for each compartment were estimated using tissue MTLP concentrations and worm compartment weights. MTLP tissue concentrations ($\mu\text{g/g}$) were multiplied by the tissue weight mean (g). The total body MTLP mass was calculated by addition of MTLP masses in each compartment. Then, total MTLP concentrations in whole body ($\mu\text{g/g}$ tissue) were estimated using total MTLP and total tissue mass.

2.3.9 Cadmium analysis.

Cd was extracted from soil sampled at the beginning ($t = 0$), at mid-term ($t = 28$ d) and at the end ($t = 56$ d) of the experiment. Cd was extracted from earthworm collected at $t=28$ d. Cd content in soil and earthworms tissues were determined by inductively coupled plasma optical mass spectroscopy (ICP-MS) after acid digestion and extraction, following a standardized method (CEAEQ, 2003b). Cd content in the tissues was determined after acid digestion extraction also following a standardized method (CEAEQ, 2003a). The detection limit was 0.5 mg Cd/ kg of soil or tissue.

2.3.10 Quality control.

The reproduction test were carried out in quadruplicates and included a negative control (soil added with water only) as recommended by international standard organizations (ISO, 1998). Mortality, growth, reproduction endpoints and other established criteria (*e.g.*, response in the negative control, temperature, and humidity) were verified against in-house control data. The Cd analysis validation was done with reference soil (TILL-1, TILL-2, TILL-3 and TILL-4) obtained from the Canadian Certified Reference Materials Project (CANMET Mining and mineral Sciences Laboratories, Ottawa, ON, Canada) and tissue standards (DORM-2, DOLT-3 and TORT-2) were obtained from the National Research Council - Institute for National Measurement Standards (NRC-INMS, Ottawa, ON, Canada)

2.3.11 Statistical analysis.

Cd concentrations in worms were expressed as mean values \pm standard errors ($n=4$ groups of 4 worms per treatment) and were compared by Student's t-tests. Other results were expressed as mean values \pm standard deviation ($n=4$ replicates per treatment). Toxicity parameters (LC50, EC50, LOEC and NOEC) were determined using the ToxCalc 5.0 software (Tidepool Scientific Software, McKinleyville, CA, U.S.A.). Correlations between reproduction endpoints, Cd and MTLP concentration in worm compartments, as well as Principal Component Analysis (PCA) were analyzed with JumpIN Software (SAS Institute). Aberrant data were excluded from analysis following an outlier analysis conducted by the software. The PCA was performed on the standardized data (correlation matrix) of 11 variables (4 MTLP measurements (whole body and 3 different tissues), 6 life-cycle parameters (5 reproduction endpoints and growth), and tissue metal concentrations).

2.4 Results:

2.4.1 Cadmium content in earthworm tissues.

At the beginning of the exposure, the measured Cd concentrations were <0.5 , 1.35 ± 0.39 , 2.58 ± 0.23 , 5.88 ± 0.19 , 10.40 ± 0.82 and 22.40 ± 2.88 mg/kg soil, respectively. The corresponding earthworm tissue concentration after 28-day exposure was 1.0 ± 0.2 , 59 ± 19 , 125 ± 10 , 233 ± 46 , 253 ± 15 and 348 ± 66 $\mu\text{g/g}$ dry tissue (Table 1).

2.4.2 Survival, growth and reproduction of earthworms exposed to Cd.

No mortality was observed in earthworms exposed for 4 weeks to the tested Cd concentrations. Preliminary studies showed that higher Cd concentrations (> 62.5 mg/kg soil, nominal) are lethal to adult *E. andrei* (data not shown). Statistically significant decreases in body weight (Table 1) and food consumption (data not shown) were observed in worms exposed to 22.4 mg/kg soil compared to controls. Decreases in cocoon production, hatched cocoon, hatchability, juvenile production were observed in earthworms exposed to different Cd concentrations compared to controls. Hatched cocoons were significantly decreased at concentrations $\geq 5.88 \pm 0.19$ mg Cd/ kg soil compared to controls (Table 1). The NOEC, LOEC, EC_{20} and EC_{50} for number of hatched cocoons were 2.58, 5.88, 2.30 and 4.22 mg/kg soil, respectively. Juvenile production was significantly reduced at concentrations $\geq 2.58 \pm 0.23$ mg Cd/ kg soil compared to controls (Table 1) The NOEC, LOEC, EC_{20} and EC_{50} for number of juveniles were < 2.58 , 2.58, 2.03 and 3.78 mg/kg soil respectively.

2.4.3 MTLP concentrations in earthworms exposed to Cd.

Figure 1 illustrates the Cd effect on the MTLP concentrations in the three body compartments of adult *E. andrei* exposed to Cd. At tissue Cd concentration $1.01\mu\text{g/g}$, gonads [MTLP], Clitellum [MTLP] and NR [MTLP] were 5.06 , 2.09 and $14.31\text{ mg/g total proteins}$, respectively. An interesting feature is the heterogeneity of basal MTLP level throughout the three body compartments. As shown in Figure 1, the clitellum has the highest MTLPs values (controls: $14.31 \pm 2.15\text{ mg/g total proteins}$), the gonads have the medium (controls: $5.06 \pm 0.81\text{ mg/g total proteins}$) and the non-reproductive tissues have the lowest levels of MTLP (controls: $2.09 \pm 0.35\text{ mg/g total proteins}$). Significant increases in MTLP concentrations were observed in gonad compartment (1.5-fold compared to the control at $10.40\text{ mg Cd/kg soil}$) and in non-reproduction-related tissues (2-fold compared to the controls at 5.88 to $22.40\text{ mg Cd/kg soil}$) in earthworms exposed to the highest concentrations. The concentrations of MTLPs were significantly higher in gonad compartment at the three highest Cd concentrations (8.71 ± 2.14 , 7.91 ± 0.94 and $9.15 \pm 0.73\text{ mg/g total proteins}$ at 5.9 , 10.4 and $22.4\text{ mg Cd/kg soil}$, respectively) compared to control ($5.06 \pm 0.81\text{ mg/g total proteins}$). The concentrations of MTLPs were significantly higher in non-reproduction-related tissue at the four highest Cd concentrations (3.20 ± 0.47 , 3.91 ± 0.23 , 5.17 ± 0.42 and $5.11 \pm 0.21\text{ mg/g total proteins}$ at 2.6 , 5.9 , 10.4 and $22.4\text{ mg Cd/kg soil}$, respectively) compared to controls ($2.09 \pm 0.35\text{ mg/g total proteins}$). No significant differences in MTLP concentration were observed in clitellum of earthworms exposed to Cd concentrations. Nevertheless, MTLP concentrations in clitellum tend to be lower at the three lower Cd doses. The EC_{50} for the the gonad MTLP, for the NR MTLP and the clitellum MTLP levels are 6.11 , 3.64 and $>30\text{ mg/kg soil d.w.}$ respectively. Figure 2 presents the effect of Cd on total MTLP levels (estimated from the three body compartments). At tissue Cd concentration ~~was~~ $1.01\mu\text{g/g}$, total [MTLP] was $336.87\mu\text{g/g tissues, fresh weight}$. Significant increase in MTLP was observed at 5.9 , 10.4 and $22.4\text{ mg Cd/kg soil}$ (232.5 , 252.5 and $347.5\mu\text{g}$

Cd/g tissues, respectively). The corresponding concentrations of MTLPs were 461.71 ± 43.94 , 511.54 ± 69.55 and 563.18 ± 23.11 $\mu\text{g/g}$ tissues, respectively, compared to 336.87 ± 42.44 $\mu\text{g/g}$ tissues in control. The EC_{50} for the estimated total MTLP levels is 12.36 mg/kg soil d.w. No significant MTLP concentrations differences were observed in juvenile tissues with increasing Cd concentrations (data not shown).

2.4.4 Correlation between reproduction endpoints, Cd tissue concentrations and MTLP concentrations.

Table 2 shows relationships between 9 measured variables and tissue Cd concentrations. Most of the parameters were strongly and significantly correlated with tissue Cd concentrations. Particularly, reproduction endpoints (number of juveniles, $R^2 = -0.91$; number of hatched cocoons, $R^2 = -0.90$; number of cocoons $R^2 = -0.91$; hatchability $R^2 = -0.81$; number of juveniles per cocoon $R^2 = -0.74$) were negatively correlated with tissue Cd concentrations ($P < 0.0001$). All MTLP concentrations (MTLP concentrations in gonads, $R^2 = -0.79$; MTLP concentrations in non reproductive tissues, $R^2 = -0.85$; total MTLP concentrations, $R^2 = -0.79$) were positively correlated with Cd tissue concentrations ($P < 0.0002$), except for MTLP concentration in clitellum which did not show significant correlation with Cd tissue concentrations ($R^2 = 0.40$; $P = 0.0506$). Table 3 presents the R^2 coefficient and significance probability for the correlations between reproduction endpoints and MTLP concentrations in different tissues. Results show significant correlations between relevant reproduction endpoints and MTLP concentration, particularly in gonads. Indeed, the number of hatched cocoons, ($R^2 = -0.80$; $P < 0.0001$; $n=18$), the total number of cocoons, ($R^2 = -0.88$; $P < 0.0001$; $n=18$), the number of juveniles, ($R^2 = -0.74$; $P = 0.0009$; $n=18$) and the hatchability ($R^2 = -0.71$; $P = 0.0010$; $n=20$) were strongly correlated with the MTLP concentrations in the gonads.

2.4.5 Principal components analysis.

Two components explained a total of 76 % of the variance, with component 1 contributing to 55 % and component 2 contributing to 21 %. This indicates that a simple 2-axis structure is adequate to explain the intercorrelations in the whole data set. The most important reproduction parameters were strongly related to the first component, while the MTLP concentrations in various tissues were strongly related to the second component. Tissue Cd concentration was related to both components.

2.5 Discussion

In agreement with the literature (Ireland, 1975; Martin and Coughtrey, 1975; Morgan and Morgan, 1988), tissue Cd concentration increased with soil Cd concentration. The tissue/soil concentration ratios decreased while soil Cd concentration increase (ratio values are 43.9, 48.4, 39.5, 24.3 and 15.5 for 1.35, 2.58, 5.88, 10.40 and 22.40 mg/kg soil, respectively; data not shown) indicating that Cd uptake mechanisms are more active at low concentration.

Lethal concentrations were avoided in our experiments to reduce interference of uptake with acute toxicity (Van Gestel *et al.*, 1991). In addition, high survival allows us to have sufficient biological materials at the end of the exposure, in order to perform MTLP measurement or tissue metal content.

Concerning the toxicity of Cd, growth and reproduction impairments were Cd doses-dependent. Effectively, results clearly demonstrated that an increase of Cd in worm tissue correlates with the decrease of reproductive functions and growth, confirming that Cd affects worm life cycle responses (Malecki *et al.*, 1982; Van Gestel *et al.*, 1991; 1992; Spurgeon *et al.*, 1994). Furthermore, results show that the earthworms were exposed to soils with higher bioaccessibility of Cd, compared to other soils used in literature for the same nominal concentrations. Effects were generally similar those observed by other researchers (Malecki *et al.*, 1982; Van Gestel *et al.*, 1991; 1992; Spurgeon *et al.*, 1994), however, the LC₅₀ and the EC₅₀-growth (> 22.40 and 11.59 mg Cd /kg soil, respectively) and EC₅₀-reproduction in the sandy soil were lower compared to artificial soil (Van Gestel *et al.*, 1991; 1992). Results confirm that Cd toxicity was higher in the sandy soil compared to other soils used previously (Malecki *et al.*, 1982; Van Gestel *et al.*, 1991; 1992; Spurgeon *et al.*, 1994). The higher toxicity of Cd is probably due to the sandy soil characteristics. Low organic matter or high sand proportions of the soil used in this study lead to

higher bioaccessibility and bioavailability of Cd (Klaassen 1995; Lanno *et al.*, 2004; Berthelot *et al.*, 2008a).

The MTLP concentrations in *E. andrei* showed significant and concentration-dependant induction by Cd, as previously described by Roesijadi (1994a) in aquatic organisms and by Ndayibagira *et al.* (2007) with the same species. Similar induction of MTs after Cd exposure was already observed in earthworms *Lumbricus terrestris* (Spurgeon *et al.*, 2004) and in *Lumbricus rubellus* (Galay-Burgos *et al.*, 2003). Correlations showed that an increase of Cd in soil and in earthworm tissues leads to an efficient increase in MTLP concentrations, as already observed by Demuyne *et al.* (2006) and Ndayibagira *et al.* (2007). The observation of a significant relationship between Cd tissue concentration and MTLP induction is consistent with other results observed in aquatic organism such as *A. Grandis* (Campbell *et al.*, 1990), *P. Grandis* (Perceval *et al.*, 2002) and *M. galloprovincialis* (Dragun *et al.*, 2004). Moreover, Cd significantly induced MTLPs in gonads compartment and non-reproductive tissues while no significant increase of MTLP concentrations in clitellum tissue was observed compared to control. High basal concentrations of MTLPs in clitellum (as evidence in unexposed earthworms) may have tempered MTLPs induction in this tissue, as described previously (Ndayibagira *et al.*, 2007). This phenomenon could also explain the absence of significant MTLP induction at the lowest Cd concentrations in the other tissues. We were also able to establish strong statistical relationships between MTLP concentrations and reproduction impairments, as described previously. Effectively, Gillis *et al.* (2002) observed significant correlations between Cd-induced production of metallothionein-like proteins and reproduction impairment in aquatic earthworm species *Tubifex tubifex* (*Oligochaeta*) and *Chironomus riparius* (*Diptera*). Interestingly, the strongest correlation in the present study occurred between reproduction endpoints and MTLP concentrations in the gonads of *E. andrei*. Then the MTLP concentrations come in the following order: non-reproductive tissue MTLPs > total MTLPs > Clitellum MTLPs concentrations.

Consequently, it can be inferred that mechanisms of MTLP accumulation are linked with reproduction mechanisms. We can hypothesize that, upon Cd exposure, MTLPs were increasing through the worm body to possibly moderate acute Cd toxicity while reproduction was impaired. Thus, adult worms could stand Cd toxicity, avoid soil contaminants, and eventually returns to favorable conditions to produce offspring after a recovery period.

However, the intensity of the MTLPs response was inconsistent throughout the organism. At day 28, the concentration of MTLPs was in the following order: clitellum > gonad > non reproduction-related tissue, confirming that the target-organs of Cd in *E. andrei* earthworm include gonads (testis and ovaries), clitellum, and other reproduction-related tissue, as already demonstrated for mammals (Waalkes and Klaassen 1985; Klaassen, 1995) and another earthworm species (Sierkeska and Urbanska-Jasik, 2002). The presence of MTLPs near reproduction-related tissues gives us an idea on the implication of such a protein to reproduction. Moreover, this localization by segmentation which showed that MTLPs was generally present at all levels is compatible with observations that showed MTs being synthesized and concentrated in chloragenous tissue surrounding the earthworm's gut (Morris *et al.*, 1999; Stürzenbaum *et al.*, 2001). We confirmed that MTLPs, formed in chloragenous tissue by specific induction mechanisms, are an early defense mechanism to prevent any damage to gonads, eggs or cocoons during Cd exposure.

This study also confirms that MTLP measurement in *E. andrei* is a relevant and useful tool for Cd soil monitoring (Galay-Burgos *et al.*, 2003; Ndayibagira *et al.*, 2007). MTLP accumulation in earthworm tissue was found to be strongly related to the presence of bioaccumulated Cd in a concentration-dependent manner. MTLPs were found to have predictive values regarding to bioaccumulated Cd in *E. andrei*, confirming the potential use of MTLP concentration measures in *E. andrei* as a Cd exposure biomarker, as suggested by Scott-Fordsman and Weeks (2000) and

Kammenga *et al.* (2000) and confirmed more recently by Demuynck *et al.* (2006) and Ndayibagira *et al.* (2007). However, we also showed that an increase of MTLPs in earthworm tissues exposed to Cd was found to be related to a decrease of reproduction. MTLPs were found to have predictive values regarding to impaired reproduction in *E. andrei*, confirming the potential use of MTLP concentration measures as an early biological effect biomarker, as suggested by Gagné and Blaise (2005).

Finally, the present study proposed an interesting approach to easily investigate intercorrelations between bioaccumulated Cd concentrations, reproduction impairments and MTLPs in different worm sections. Effectively, multivariate analysis has successfully been used in the statistical treatment of the multiparameter assessment (reproduction endpoints, growth, soil and tissue Cd concentrations, MTLP concentrations in segments), in order to establish relationships between all the measured parameters and as previously and recently described (Perceval *et al.*, 2002; Galay-Burgos *et al.*, 2003; 2005). While the PCA confirmed relationships between Cd tissue concentration, reproduction impairment and MTLP accumulation in earthworms, this statistical analysis showed that the most of the variation observed can be reduced to two components that explained 74 % of total variance. Consequently, a simple two-axis representation was sufficient to easily investigate the statistical relationships between all parameters and the MTLP concentrations in various tissues.

2.6 Conclusion:

This study showed that Cd is uptaken by earthworm *E. andrei* and affects their survival, growth and reproductive functions. In regards to our results and previous literature, soil characteristic modulate the toxicity of Cd to *E. andrei*, leading to higher bioavailability in the soil test. Cd induced the MTLP in all earthworm portions and in a dose-dependent manner. MTLPs concentration measurement in worm tissue homogenates seems to be a suitable Cd exposure- and early biological effect- biomarker, when combined to the appropriate statistical tools. However, link between MTLP concentration and Cd toxicity remains unknown and still needs investigation. Finally, in the actual case of multiple contamination in RTA, i.e. metals and energetic substances, further experiments have now to be undertaken because of unknown response of earthworm MTLPs to other toxicants (e.g. Pb, HMX).

2.7 Acknowledgements:

We thank André Marois from Defence Research and Development Canada – Valcartier (DRDC-Valcartier, Canadian Ministry of National Defence) for soil collected at Valcartier CFB (Qc, Canada). We are also grateful Drs. Sonia Thiboutot and Guy Ampleman from DRDC-Valcartier, for their support. Gratitude is also expressed to Philip Spears from UQAM/TOXEN, to Louise Paquet from the Environmental Chemistry Group as well as Manon Sarrazin, Virgine Bérubé, Dr. Geoffrey Sunahara and all the Applied Ecotoxicology Group, Biotechnology Research Institute – National Research Council of Canada for technical assistance and scientific advice.

2.8 References:

- Ampleman, G., S. Thiboutot, J. Lewis, A. Marois, A. Gagnon et M. Bouchard. 2004. "Evaluation of the contamination by explosives and metals in soils, vegetation, surface water and sediment at Cold Lake Air Weapons Range (CLAWR), Alberta, Phase II, Final Report". Report DRDC-VALCARTIER-TR-2004-204. Defense R&D Canada, Valcartier, QC, CA and Cold Region Research and Engineering Lab, Hanover, NH, USA.
- Andrews, G. K. 2000. "Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions". *Biochem. Pharmacol.*, vol. 59, no. 1, p. 95-104.
- Bengtsson, G., S. Nordstrom et S. Rundgren. 1983. "Population density and tissue metal concentration of Lumbricids in forest soils near a brass mill". *Environ. Poll.*, vol 30, p. 87-108.
- Bengtsson, G., H. Ek et S. Rudgren. 1992. "Evolutionary response of earthworms to long term metal exposure". *Oikos*, vol. 63, p. 289-297.
- Berthelot, Y. 2008a. *Évaluation de la biodisponibilité des métaux et des matériaux énergétiques dans les sols provenant de sites d'entraînement militaire*. Thèse présentée comme exigence partielle au doctorat en sciences de l'environnement. Université du Québec à Montreal, Montréal, Québec.
- Berthelot, Y., E. Valton, A. Auroy, B. Trottier et P.-Y. Robidoux. 2008b. "Integration of toxicological and chemical tools to assess the bioavailability of metals and energetic compounds in contaminated soils." *Chemosphere*, vol. 74, no. 1, p. 166-177.
- Berthelot Y, Trottier B, Robidoux P.-Y. 2009. "Assessment of soil quality using bioaccessibility-based models and a biomarker index". *Environ. Int.*, vol. 35, no. 1, p. 83-90.
- Bradford, M. M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical Biochemistry*, vol. 72, p. 248-254.
- Bremner, I. et J.H. Beatie. 1990. "Metallothionein and the trace minerals". *Annu.Rev.Nutr.*, vol. 10, p. 63-83.
- Campbell, P. G. C., A. Tessier, Y. Couillard. et S. Micallef. 1990. "Biochemical indicators of environmental stress caused by heavy metals". Progress report 1 - Wildlife Toxicological Fund, Environment Canada, Ottawa, Ontario. Rapport Scientifique 294 - INRS-Eau, Ste-Foy, Quebec.
- CCME - Canadian Council of Ministers of the Environment. 2006. "Canadian soil quality guidelines for the protection of environmental and human health: Summary tables" Updated in November 2006. In: *Canadian Environmental Quality Guidelines*, 1999, Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg, Manitoba.

- CEAEQ - Centre d'Expertise en Analyse Environnemental du Québec. 2003a. "Détermination des métaux dans les tissus animaux : méthode par spectrométrie d'émission au plasma d'argon après minéralisation acide". Méthode MA 207-Met1.0. Québec, QC, Canada.
- CEAEQ - Centre d'Expertise en Analyse Environnemental du Québec. 2003b. "Spectrométrie de masse à source ionisante au plasma d'argon". Méthode MA 200-met1.1. Québec, QC, Canada.
- CEPA - Canadian Environmental Protection Act. 1994. "Priority Substances List. Assessment report. Cadmium and its compounds" Government of Canada. Environment Canada and Health Canada, Ottawa, Ontario.
- Demuynck, S., F. Grumiaux, V. Mottier, D. Schilkorski, S. Lemièrre et A. Leprêtre. 2006. "Metallothionein response following cadmium exposure in the oligochaete *Eisenia fetida*". *Comp. Biochem. Physiol. C.*, vol. 144, p. 34-36.
- Dragun, Z., M. Erk, B. Raspor, D. Ivankovic et J. Pavicic. 2004. "Metal and metallothionein level in the heat-treated cytosol of gills of transplanted mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk". *Environ. Int.*, vol. 30, p. 1019-1025.
- Furst A. et G. Nguyen. 1989. "Cadmium-induced metallothionein in the earthworm *Lumbricus rubellus*". *Biol. Trace. Elem. Res.*, vol. 21, p. 81-85.
- Gagné F. et C. Blaise. 2005. "Review of biomarkers and new techniques for in situ aquatic studies with bivalves". In: *Environmental toxicity testing*. K.C. Thompson, K. Wadhia and A.P. Loibner (eds). Oxford (UK): Blackwell publishing, and Boca Raton (USA): CRC Press. pp 206-228.
- Galay-Burgos, M., D. J. Spurgeon, J. M. Weeks, S. R. Stürzenbaum, A. J. Morgan et P. Kille. 2003. "Developing a new method for soil pollution monitoring using a molecular genetic biomarker". *Biomarkers*, vol. 8, no. 3-4, p. 229-239.
- Galay-Burgos, M., C. Winters, S. R. Stürzenbaum, P. F. Randerson, P. Kille et A. J. Morgan. 2005. "Cu and Cd effects on the earthworm *Lumbricus rubellus* in the laboratory: Multivariate statistical analysis of relationship between exposure, biomarkers and ecologically relevant parameters". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, p. 1757-1763.
- Gillis, P. L., L. C. Diener, T. B. Reynoldson et D. G. Dixon. 2002. "Cadmium-induced production of metallothionein-like protein in *Tubifex tubifex* (Oligochaeta) and *Chironomus riparius* (Diptera): correlation with reproduction and growth". *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 21, p. 1836-1844.
- Gruber, C., S. R. Stürzenbaum, P. Gehrig, R. Sack, P. Hunziker, B. Berger et R. Dallinger. 2000. "Isolation and characterization of a self-sufficient one-domain protein (Cd)-metallothionein from *Eisenia foetida*". *Eur. J. Biochem.*, vol. 267, p. 573-582.
- Ireland, M. P. 1975. "Distribution of lead, zinc and calcium in *Dendrobaena rubida* (oligochaete) living in soil contaminated by base metal mining in Wales". *Comp. Biochem. Physiol. B.*, vol. 52, p. 551-555.

- ISO. 1993. "Soil quality - Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate". ISO 11268-1. International Organisation for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO. 1998. "Soil quality - Effect of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction". ISO 11268-2. International Organisation for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Kammenga, J. E., R. Dallinger, M. H. Donker, H.-R. Köhler, V. Simonsen, R. Triebkorn et J. M. Weeks. 2000. "Biomarkers in terrestrial invertebrates for ecotoxicological soil risk assessment". *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 164, p. 93-147.
- Klaassen, C. D. 1995. *Casarett and Doull's toxicology : The basic science of poisons. 5th edition*. New York (USA): McGraw-Hill. 912p.
- Klaassen, C. D., J. Liu et S. Choudhuri. 1999. "Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 39, p. 267-294.
- Kwang, W. A., H. S. Shin, C. Y. Choi. 2008. "Physiological responses and expression of metallothionein (MT) and superoxide dismutase (SOD) mRNAs in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to benzo[a]pyrene". *Comp. Biochem. Physiol. B.*, vol. 149, no. 3, p. 534-539.
- Lachance, B., P.-M. Bergeron, V. Bérubé, G. I. Sunahara et P.-Y. Robidoux. 2008. "Validation of environmental military threshold values for explosives in soil". CNRC Report #49926. National Defence, Ottawa, Ontario, and NRC-BRI, Montréal, Quebec.
- Lanno, R., J. Wells, J. Conder, K. Bradham et N. Basta. 2004. "The bioavailability of chemicals in soil for earthworms". *Ecotox. Environ. Safe.*, vol. 57, p. 39-47.
- Malecki, M. R., E. F. Neuhauser et R. C. Loehr. 1982. "The effects of metals on the growth and reproduction of *E. foetida* (Oligochaete, Lumbricidae)". *Pedobiologia*, vol. 24, p. 129-137.
- Marois, A., A. Gagnon, S. Thiboutot, G. Ampleman, M. Bouchard. 2004. "Caractérisation des sols de surface et de la biomasse dans les secteurs d'entraînements, Base des Forces Canadiennes, Valcartier". Report DRDC-VALCARTIER-TR-2004-206. Defense R&D Canada, Valcartier, Quebec.
- Martin, M. H. et P. J. Coughtrey. 1975. "Preliminary observations on the levels of cadmium in a contaminated environment". *Chemosphere*, vol. 3, p. 155-160.
- Morgan, A. J. et B. Morris. 1982. "The accumulation and intracellular compartmentation of cadmium, lead, zinc and calcium in two earthworm species (*Dendrobaena rubida* and *Lumbricus rubellus*) living in highly contaminated soil". *Histochemistry*, vol. 75, p. 269-285.
- Morgan, J. E. et A. J. Morgan. 1988. "Earthworms as biological monitors of cadmium, copper, lead and zinc in metalliferous soils". *Environ. Poll.*, vol. 54, p. 123-138.

- Morgan, J. E. et A. J. Morgan. 1990. "The distribution of cadmium, copper, lead, zinc and calcium in the tissue of the earthworm *Lumbricus rubellus* sampled from one uncontaminated soil and four polluted soils". *Oecologia*, vol. 84, p. 559-566.
- Morgan, A. J., J. E. Morgan, M. Turner, C. Winters et A. Yarwood. 1993. "Metals relationships of earthworms". In: *Ecotoxicology of metals in invertebrates*, Dallinger R. et Rainbow P. S. (Eds.) Boca Raton (USA): Lewis Publishers. pp. 333-358.
- Morris, C. A., S. Sturzenbaum, B. Nicolaus, A. J. Morgan, J. L. Harwood et P. Kille. 1999. "Identification and characterization of metallothioneins from indicator species". In: *Metallothionein IV*, Klaassen, C. (eds), Basel (Switzerland): Birkhauser Verlag. pp 621-627.
- Ndayibagira, A., G. I. Sunahara et P.-Y. Robidoux. 2007. "Rapid isocratic HPLC quantification of metallothionein-like proteins as biomarkers for cadmium exposure in the earthworm *Eisenia andrei*". *Soil. Biol. Biochem.*, vol. 39, p. 194-201.
- OECD. 1984. "Guideline for testing chemicals No.207. Earthworm, acute toxicity tests". Organisation pour la Coopération et le Développement Economique, Paris, France.
- Peakall, D. B. 1994. "Biomarkers, the way forward in environmental assessment". *Toxicol. Ecotoxicol. News.*, vol. 1, p. 55-60.
- Perceval, O., B. Pinel-Alloul, G. Méthot, Y. Couillard, A. Giguère, P. G. C. Campbell et L. Hare. 2002. "Cadmium accumulation and metallothionein synthesis in freshwater bivalves (*Pyganodon grandis*): relative influence of the metal exposure gradient versus limnological variability". *Environ. Poll.*, vol. 118, p. 5-17.
- Robidoux, P.-Y., G. Bardai, M. Sarrazin, L. Paquet, P. Gong, J. Hawari et G. I. Sunahara. 2000. "Ecotoxicological risk assessment of an antitank firing range contaminated with explosives". NRCC Report #43317. NRC, BRI, Montréal, Québec. 64p.
- Robidoux, P.-Y., J. Hawari, S. Thiboutot, G. Ampleman et G. I. Sunahara. 2001. "Chronic toxicity of octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX) in soil using the earthworm (*Eisenia andrei*) reproduction test". *Environ. Poll.*, vol. 111, p. 283-292.
- Robidoux P.-Y., J. Hawari, S. Thiboutot et G. I. Sunahara. 2002. "Ecotoxicological risk assessment of explosives contaminated sites". In: *Environmental Analysis of Contaminated Sites: Toxicological Methods and Approaches*. Sunahara G. I., Renoux A. Y., Gaudet C. L., Thellen C., Pilon A. (Eds). Sussex (UK): John Wiley and Sons. pp 335-359.
- Robidoux P.-Y., C. Dubois, J. Hawari et G. I. Sunahara. 2004a. "Assessment of an Antitank Firing Range using *Lumbricus terrestris* and *Eisenia andrei* in mesocosms and laboratory studies". *Ecotoxicology*, vol. 13, p. 603-614.

- Robidoux, P.-Y., P. Gong, M. Sarrazin, G. Bardai, L. Paquet, J. Hawari, C. Dubois et G. I. Sunahara. 2004b. "Toxicity assessment of contaminated soils from an antitank firing ranges". *Ecotox. Environ. Safe.*, vol. 58, p. 300–313
- Robidoux P.-Y., B. Lachance, F.-O. Dion, L. Didillon et G. I. Sunahara. 2006. "Development of Ecological Criteria and Human Health Criteria for Energetic Materials to Ensure Training Sustainability of Canadian Forces". Final Report CNRC #45936. National Defence, Ottawa, ON and NRC-BRI, Montréal, Québec.
- Robidoux P.-Y., B. Lachance, S. Thiboutot, G. Ampleman et G. I. Sunahara. 2008. "Development of ecological and human health preliminary energetic Materials soil concentrations for military training sustainability of Canadian Forces". SETAC Word Congress Abstract Book, Aug 2008, Sydney, Australia.
- Roesijadi, G. 1994a. "Metallothionein induction as a measure response to metal exposure in aquatic animals". *Environ. Health. Perspect.*, vol. 102, no. 12, p. 91-96.
- Roesijadi, G. 1994b. "Metallothionein and its role in toxic metal regulation". *Comp. Biochem. Physiol. C.*, vol. 113, no. 2, p. 117-123.
- Scott-Fordsman, J. J. et J. M. Weeks. 2000. "Biomarkers in earthworms". *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 165, p. 117-159.
- Siekierska, E. et D. Urbanska-Jasik. 2002. "Cadmium effect on the ovarian structure in earthworm *Dendrobaena veneta* (Rosa)". *Environ. Poll.*, vol. 120, p. 289-297.
- Spurgeon, D. J., S. P. Hopkin et D. T. Jones. 1994. "Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): Assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems". *Environ. Poll.*, vol. 84, p. 123-130.
- Spurgeon, D. J. et S. P. Hopkin. 1996. "Effects of metal contaminated soils to the growth, sexual development, and early cocoon production of the earthworm *Eisenia fetida*, with particular reference to Zinc". *Ecotox. Environ. Safe.*, vol. 35, p. 86-95.
- Spurgeon, D. J., S. R. Stürzenbaum, C. Svendsen, P. K. Hankard, A. J. Morgan, J. M. Weeks and P. Kille. 2004. "Toxicological, cellular and gene expression responses in earthworms exposed to copper and cadmium". *Comp. Biochem. Biophysiol. C.*, vol. 38, p. 11-21.
- Stürzenbaum, S. R., P. Kille et A. J. Morgan. 1998. "The identification, cloning and characterization of earthworm metallothionein". *FEBS Letter*, vol. 431, p. 437-442.
- Stürzenbaum, S. R., C. Winters, M. Galay, A. J. Morgan et P. Kille. 2001. "Metal ion trafficking in earthworms: identification of a cadmium-specific metallothionein". *Journal of Biological Chemistry*, vol. 36, p. 34013-34018.
- Suzuki, K. T., M. Yamamura et T. Mori. 1980. "Cadmium-binding proteins induced in the earthworm". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 9, p. 415-424.

- Thiboutot, S., G. Ampleman, A. Marois, A. Gagnon, M. Bouchard, A. Hewitt, T. Jenkins, M. Walsh, K. Bjella, C. Ramsey et T. A. Ranney. 2004. "Environmental conditions of surface soils, CFB Gagetown Training area : Delineation of the presence of munitions related residues (Phase III, final report)". Report DRDC-VALCARTIER-TR-2004-205. Defense R&D Canada, Valcartier, QC, CA and Cold Region Research and Engineering Lab, Hanover, NH, USA.
- U.S.E.P.A. – United States Environment Protection Agency. 1989. "Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites". Report US-EPA 600/3-88/029. US-EPA Environmental Research Laboratory, Corvallis, Oregon. 98p.
- U.S.E.P.A. – United States Environment Protection Agency. 2005. "Ecological soil screening levels for cadmium. Interim final. OSWER directive 9285.7-65". Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington D.C.
- Van Gestel, C. A. M. et W. A. Van Dis. 1988. "The influence of soil characteristics on the toxicity of four chemicals to the earthworm *Eisenia fetida andrei* (Oligochaeta)". *Biol. Fert. Soils.*, vol. 6, p. 262-265.
- Van Gestel, C. A. M., W. A. Van Dis, E. M. Dirven-Van Bremen, P. M. Sparenburg et R. Baerselman. 1991. "Influence of cadmium, copper and pentachlorophenol on growth and sexual development of *Eisenia andrei* (Oligochaeta; Annelida)". *Biol. Fert. Soils.*, vol. 12, p. 117-121.
- Van Gestel, C. A. M., E. M. Dirven-Van Breemen, R. Baerselman, H. J. B. Emans, J. A. M. Janssen, R. Postuma et P. J. M. Van Vliet. 1992. "Comparison of sublethal and lethal criteria for nine different chemicals in standardized toxicity tests using the earthworm *Eisenia andrei*". *Ecotox. Environ. Safe.*, vol. 23, p. 206-220.
- Yamamura, M., T. Mori et K.T. Suzuki. 1981. "Metallothionein induced in the earthworm". *Experientia*, vol. 37, p. 1187-1189.
- Waalkes, M. P. et C. D. Klaassen. 1985. "Concentration of metallothionein in major organs of rats after administration of various metals". *Fundamental and applied toxicology*, vol. 5, p. 473-477.

2.9 Table index

Table **2.1** Effects of Cd soil concentration on adult weight change and on reproduction endpoints in *E. andrei*.

Table **2.2** Reproduction endpoint responses and certain MTLP levels correlate with tissue Cd concentration in *Eisenia andrei*.

Table **2.3** Correlations between the reproduction endpoints and MTLP concentrations in the three body compartments and in whole worm tissue.

2.10 Figure caption

Figure **2.1** Effect of Cd tissue concentration on MTLP concentration in different *E. andrei* tissues after 28 days of exposure.

Figure **2.2** Effects of Cd tissue concentration on MTLP concentration in *E. andrei* whole body after 28 days of exposure.

Figure **2.3** Principal component analysis graph with Varimax rotation and Kaiser Normalization for each variable.

Table 2.1 Effects of Cd on adult weight change (28 days) and on reproduction endpoints (56 days) in *E. andrei*.

Note, Stars (*) represent significant difference compared to controls ($p < 0.005$, $n=4$).

Parameters	Cd soil concentration (mg/kg soil d.w., nominal)					
	0	2	4	8	15	30
Cd soil concentration (mg/kg soil d.w., measured)	0.0	1.4 ±0,4	2.6 ±0,2	5.9 ±0,2	10.4 ±0,8	22.4 ±2,9
Cd body load (µg/g fresh tissue, measured)	1.0 ±0,2	59 ±19	125 ±10	233 ±46	253 ±15	348 ±66
Weight gain (mg ± SD; 28d)	159.2 ±29,6	169.2 ±73,5	168 ±56,7	147.9 ±64,9	93.3 ±45,0	21.8 ±69,5 *
Cocoon number (± SD; 56d)	60.5 ±15,3	61.8 ±7,0	61.5 ±9,1	40.3 ±10,7	27.3 ±1,5 *	4.3 ±3,3 *
Number of Hatched cocoons (+ SD; 56d)	32.3 ±7,8	32.8 ±11,4	38.8 ±11,7	11.3 ±5,3 *	8.5 ±4,2 *	0.3 ±0,5 *
Number of Juveniles (+ SD; 56d)	174 ±19,8	159.5 ±33,2	112 ±31,9 *	29.8 ±15,2 *	15 ±9,6 *	0 *
Number of Juveniles per cocoon (+ SD; 56d)	2.8 ±0,8	2.9 ±0,7	2.9 ±0,6	2.6 ±0,7	1.7 ±0,4	0 *
Hatchability (%; + SD; 56d)	50.1 ±4,3	52.1 ±5,1	62.7 ±11,6	27.8 ±9,9 *	30.8 ±14,4 *	6.3 ±12,5 *
Total Biomass (mg ± SD; 56d)	0.8 ±0,4	0.8 ±0,6	1 ±0,3	0.4 ±0,3	0.1 ±0,1 *	0 *

Table 2.2 Reproduction endpoint responses and certain MTLP levels correlate with tissue Cd concentration in *Eisenia andrei*.

Variables	Correlations with Tissue Cd concentrations		
	R ²	P	n
Juveniles	-0.91	< 0.0001	20
Hatched cocoons	-0.90	< 0.0001	21
Total cocoons	-0.91	< 0.0001	23
Hatchability	-0.81	< 0.0001	22
Juveniles per cocoon	-0.74	< 0.0001	24
gonad [MTLP]	0.79	< 0.0002	20
clitellum [MTLP]	0.40	0.0506	24
NR tissue [MTLP]	0.85	< 0.0001	23
Whole body [MTLP]	0.79	< 0.0001	23

Note, Coefficient correlation (R²), significance probability (P) and number of observations (n) are given for each correlation between variables and tissue Cd concentration. Aberrant data were removed by Jackknife distance. NR: non-reproductive

Table 2.3 Correlations between the reproduction endpoint responses and MTLP concentrations in the three body compartments and in whole worm tissue.

Reproduction parameters	Correlations with							
	Gonad MTLP concentrations		Clitellum MTLP concentrations		NR tissue MTLP concentrations		Total MTLP concentrations	
	R2	P(n=18*)	R2	P(n=18*)	R2	P(n=19*)	R2	P (n=20*)
Total cocoons	-0.88	<0.0001	-0.63	0.0051	-0.72	0.0005	-0.7	0.0036
Hatched cocoons	-0.8	<0.0001	-0.54	0.0211	-0.78	0.0001	-0.64	0.0023
Juveniles	-0.74	0.0009	-0.54	0.0206	-0.8	<0.0001	-0.65	0.0019
Hatchability	-0.71	0.001	-0.62	0.006	-0.76	0.0002	-0.62	0.0036
Juveniles/ cocoons	-0.75	0.0003	-0.8	0.0001	-0.63	0.0036	-0.62	0.0033

Note, Correlation coefficient (R^2), significance probability (P) and number of observations (n) are given for each pairs of variables. Some observations are missing due to missing or aberrant data. NR: Non-reproductive

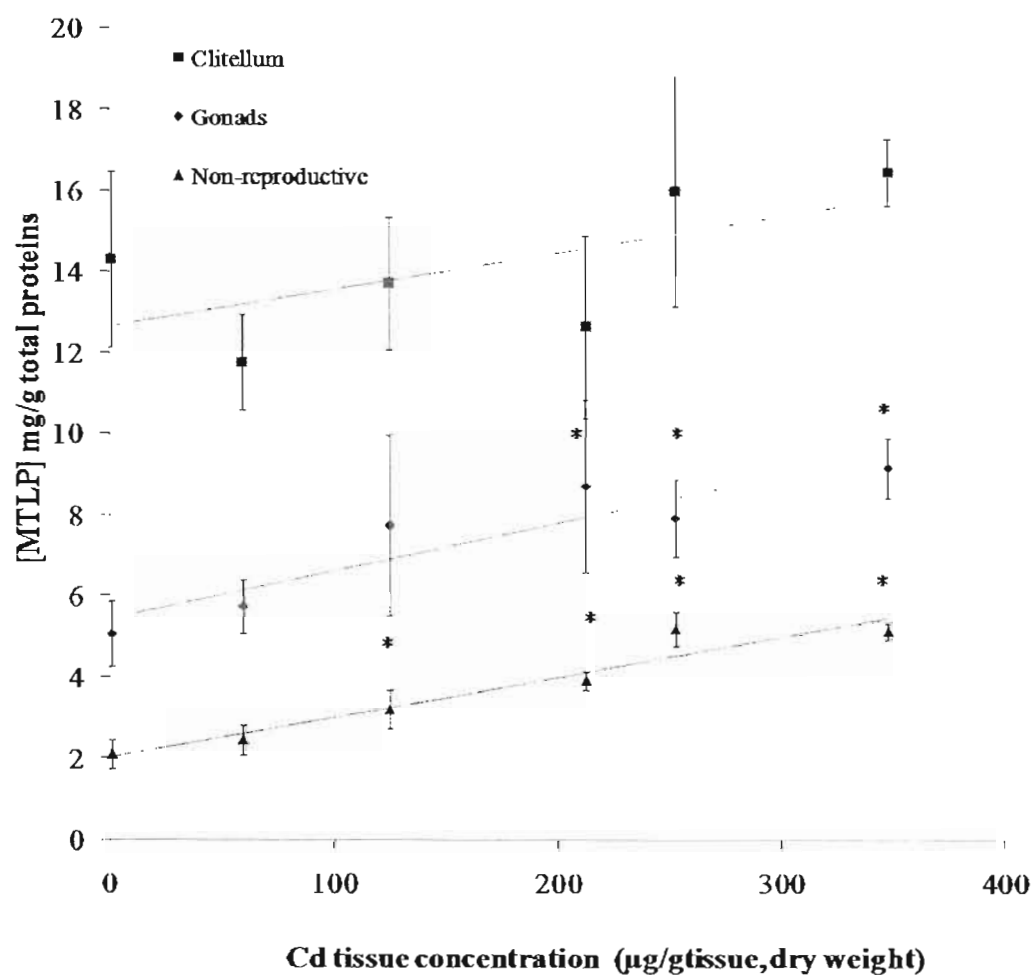


Figure 2.1 Effect of Cd tissue concentration on MTLP concentration in different *E. andrei* compartments (gonads, clitellum and non reproductive tissue) after 28 days of exposure.

Note, X-bars are standard deviation. NR: *Non-reproductive*. Stars (*) represent significant difference compared to controls (Dunnett's test, $n=4$, $p < 0.05$).

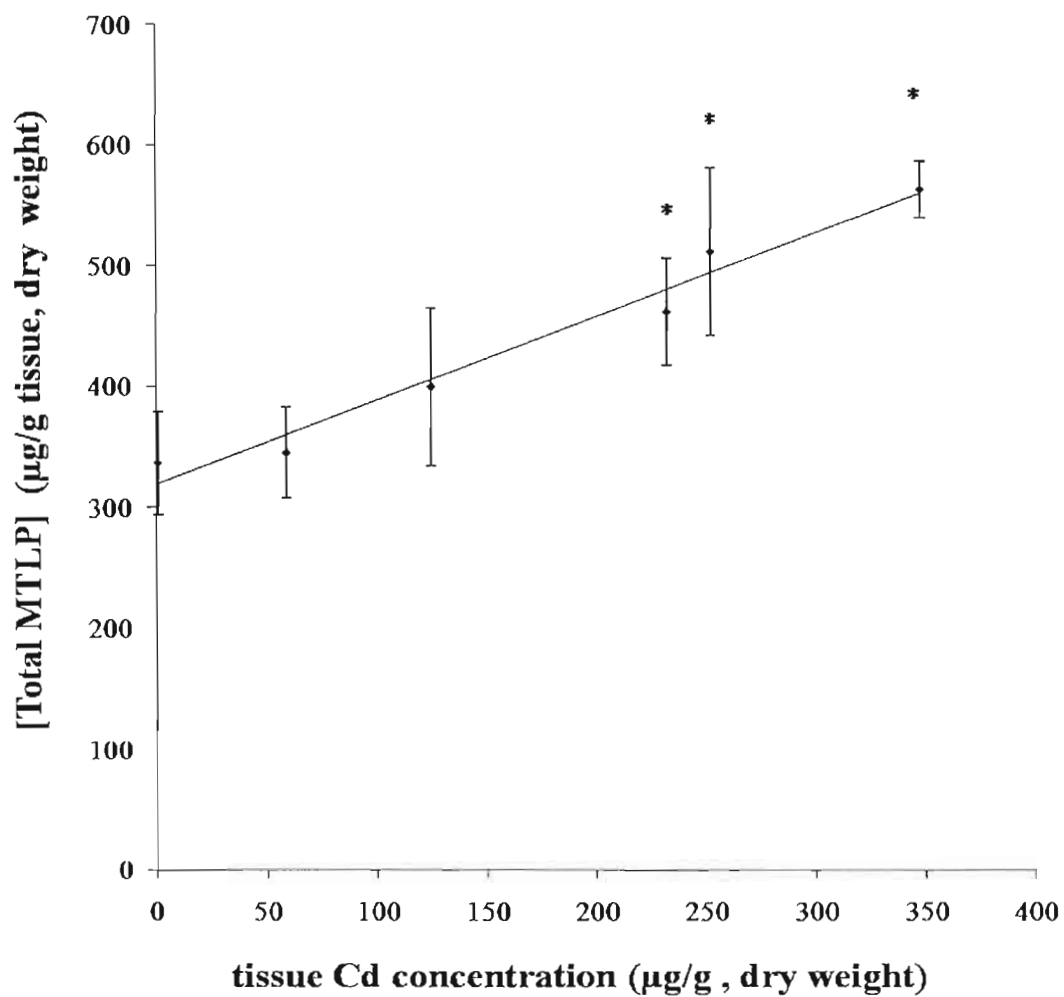


Figure 2.2 Effects of tissue Cd concentration on MTLP concentration in *E. andrei* whole body after 28 days of exposure.

Note, X-bars are standard deviation. Stars (*) indicate significant difference compared to controls (Dunnett's, $n=4$, $p < 0.05$).

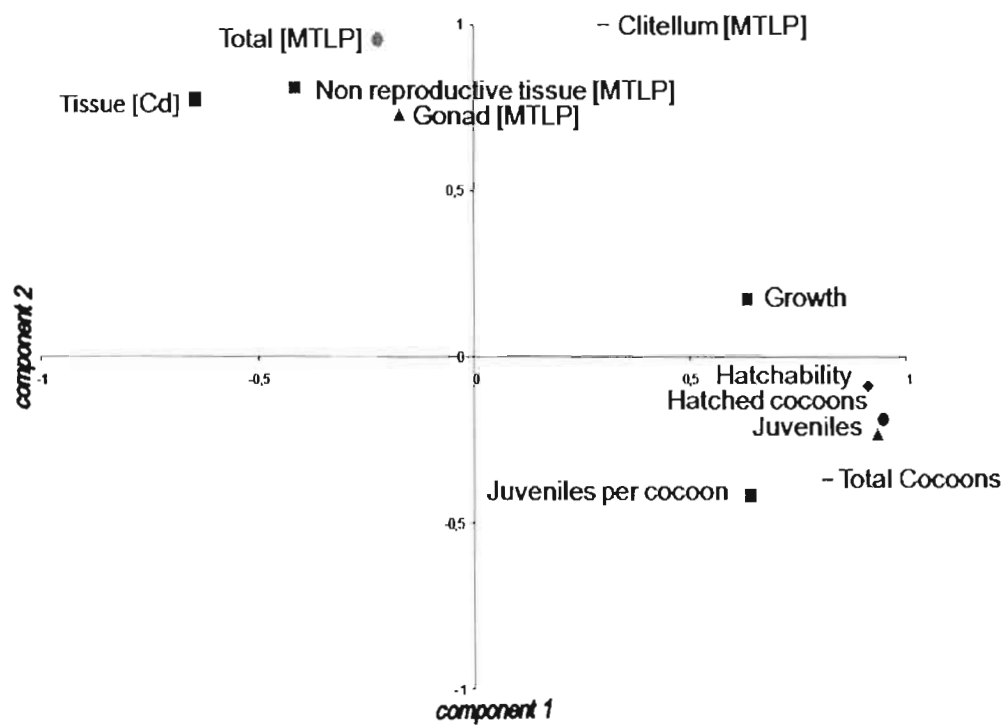


Figure 2.3 Principal component analysis graph with Varimax rotation and Kaiser Normalization for each variable.

Note, Abscissa axis (X-axis) represents the first component and Ordinate axis (Y-Axis) represents the second.

CHAPITRE III

Effets d'exposition au Pb et au HMX en un sol sablonneux sur les concentrations de protéines de type métallothionéine et relations avec la reproduction d'*Eisenia andrei*.

Ce chapitre a été soumis à la revue *Ecotoxicology and Environmental Safety* sous le titre suivant :

Effects of lead and HMX exposures in a sandy soil on metallothionein-like protein concentrations and relationships to *Eisenia andrei* reproduction

Blanchard M.^{1,2}, Berthelot Y.^{1,2}, Trottier B.², Robidoux P.Y.^{1,2*}

¹ Applied Ecotoxicology Group, Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada, 6100 Royalmount Av., Montreal, Quebec, Canada, H4P 2R2

² Research Center for Environmental Toxicology (TOXEN), Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale Centre-ville, Montréal, Quebec, Canada, H3C 3P8

3.1 Abstract.

Lead (Pb) and octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX) are major toxicants present in military soil, and few guidelines have been established to assess the soil of Range and Training Areas (RTA). This article shows the relationship between metallothionein-like protein (MTLP) concentrations in reproductive tissue and effects on reproduction of *E. andrei* after exposure to Pb and HMX. Following exposure to Pb or HMX and dissection of adult earthworm, MTLP concentrations were measured in reproductive (gonads, clitellum) and non-reproductive tissues. Using measurements in the whole earthworm body, no significant increase in MTLP concentrations was observed after exposure to HMX and Pb, suggesting that toxicants cannot induce significant or measurable quantities of MTLPS in adult earthworm tissues. However, following earthworm body segmentation in three different portions, a significant decrease of MTLP was observed in the gonad and clitellum of earthworm exposed to the highest Pb concentrations. In addition, body segmentation allowed observation of changes in MTLP concentrations in the earthworm exposed to HMX. MTLP concentrations significantly increased in non-reproductive tissue and decreased in gonads, while HMX tissue content increased and reproduction decreased with respect to HMX soil concentration. Since MTLPS are implicated in the cell protection against oxidative stress and HMX might act as an electron acceptor and should then be considered as an oxidant, results suggesting that HMX indirectly induced the concentrations of MTLP in non reproduction related earthworm tissues by producing ROs. Decreased of MTLPS quantities in gonads and reproduction impairment should then be explained by a cell death mechanism caused by the energetic substance. Moreover and for both toxicants, a simple 2- or 3-axis graphic representation resulting of a multivariate analysis permit to investigate statistical relationships between the different sublethal parameters and MTLP concentrations. Multivariate analysis also confirmed that MTLP concentrations in tissues are correlated neither with Pb soil and tissue concentrations, nor with Pb reproduction impairment.

Keywords: Metallothionein-like protein; metal, energetic material, Pb; HMX; Reproduction; Earthworms;

3.2 Introduction.

Military Range Training Areas (RTA) are contaminated by metals present in shell arms such as lead (Pb) and by energetic materials (EM) such as octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX) and its degradation products. Previous studies showed that lead was abundant (Thiboutot *et al.*, 2004; Berthelot *et al.*, 2008) and that HMX was the major polynitro-organic compound in soil of RTA (Robidoux *et al.*, 2004a and 2004b). HMX was also the only explosive detected in earthworm tissues from in-situ mesocosms studies (Robidoux *et al.*, 2004a). Soil from the RTA can affect the survival and the reproduction of earthworms (Simini *et al.*, 2004a; Robidoux *et al.*, 2000a; Savard 2005; Savard *et al.*, 2007; Berthelot *et al.*, 2008). HMX can only partially explain the observed global toxicity of RTA soils (Robidoux *et al.*, 2004b) but metals coming from the ammunitions or others sources (particularly Pb) may contribute to the soil toxicity (Robidoux *et al.*, 2004b). For example, at Gagetown (NB, Canada) Canadian Force base (CFB), Pb concentrations in soil samples collected at RTA ranged from 108 to 88200 mg Pb / kg soil and HMX concentrations in soil samples ranged from 17.1 to 1040 mg HMX / kg soil around the targets (Thiboutot *et al.*, 2004). At Valcartier (QC, Canada) CFB, soil samples collected at RTA contained 3810 to > 10,000 mg Pb / kg soil and up to 465 mg HMX / kg soil near targets (Marois *et al.*, 2004). In another study, separate analyses of different soil samples taken at the same areas of a RTA showed high concentrations of metals such as 3 300 mg Pb/kg (dry soil) (Robidoux *et al.*, 2004b). The Canadian Environmental Quality Guidelines (CEQG) for Pb are 70, 140, 260 and 600 mg/kg soil d.w. for agrarian, residential, commercial and industrial soil, respectively (CCME, 2006). Soil Concentrations for Military Training Sustainability (SCMTS) have been developed for EM on RTA (Robidoux *et al.*, 2006; Lachance *et al.*, 2008). To ensure military training sustainability, the environmental SCMTS suggest that HMX concentrations in soil should be lower than 89 mg/kg.

The toxicity of different EM has been investigated but their mechanisms of action are poorly understood. The effects of heavy metals are generally fairly well known but the toxicity of metals mixture present on RTA is still poorly documented. Furthermore, the interactions between metals and organic contaminants can potentially lead to 4 types of joint actions (similar-noninteractive, similar-interactive [with synergetic or potentiation effects], dissimilar-noninteractive and dissimilar-interactive; Savard *et al.*, 2005, Savard 2007). Nevertheless, a recent study showed that Pb and HMX have dissimilar-non-interactive joint action (Savard *et al.*, 2007). However, environmental criteria and benchmarks are almost always based on the toxicity of single substances. Moreover, few toxicity studies consider soil characteristics and the bioavailability of these contaminants (Berthelot *et al.*, 2008, 2009).

Lead is lethal to invertebrates and induces growth impairment, as described in the literature (Neuhauser *et al.*, 1985; Spurgeon *et al.*, 1994; Spurgeon and Hopkin 1995; Davies *et al.*, 2003a, 2003b; Savard, 2005). The reproduction of earthworm is also affected by Pb, causing a decrease in fertility and damages to the embryo, thus reducing hatching (Spurgeon *et al.*, 1994; Klaassen, 1995; Spurgeon and Hopkin 1995; Davies *et al.*, 2003b; Savard, 2005). Earthworms accumulate Pb and high soil concentrations can affect the density, viability, cocoon production, growth and sexual development of earthworms (Spurgeon and Hopkin, 1996).

HMX is not lethal to earthworms (Phillips *et al.*, 1993; Robidoux *et al.*, 2000b, 2001, 2002; Savard, 2005; Savard *et al.*, 2007). As an example, HMX was not lethal for *Eisenia andrei* at concentrations as high as 3013 mg HMX/kg dry soil (Robidoux *et al.*, 2000b, 2001). However HMX showed sub-lethal effects to earthworm *E. andrei* in artificial (Robidoux *et al.*, 2000b, 2001) and sandy forest soils (Robidoux *et al.*, 2002). Concentration-dependent weight losses induced by HMX were observed after a 14-day exposure at concentrations ranging from 50 to

500 mg/kg dry soil (Phillips *et al.*, 1993). Furthermore, HMX induces reproduction impairment, *i.e.* a reduction of cocoon and juvenile production and a decrease of hatchability in compost earthworms *E. andrei* (Robidoux *et al.*, 2002; Berthelot *et al.*, 2008), or *E. foetida* (Simini *et al.*, 2004a, 2004b) and in potworm *Enchytraeus crypticus* (Kuperman *et al.*, 2004).

To further investigate the effects of such contaminants on biota, cellular and biochemical tools have been used. Robidoux *et al.* (2002) measured Neutral Red Retention Time (NRRT) in earthworm coelomocytes in order to assess the potential toxicity of RTA soils. Since explosives and metals are known to induce oxidative stress, Savard (2005) measured earthworm enzyme activity, such as superoxyde dismutase (SOD) and catalase (CAT). Different biomarkers have been used to assess environmental toxicants (Astley *et al.*, 1999; Galloway *et al.*, 2004; Spurgeon *et al.*, 2004; Lukkari *et al.*, 2004). These biomarkers have been compared to the reproduction endpoints of *E. andrei* and are considered among the most relevant parameters to assess chronic toxicity in earthworms (Spurgeon *et al.*, 2004; Savard *et al.*, 2005; Berthelot *et al.*, 2008). The metallothionein-like protein (MTLP) induction is known to be a response to metal stress (Roesijadi 1994a; 1994b; Klaassen, 1995; Ndayibagira *et al.*, 2007) but the potential induction following Pb exposure is still debated. Some studies suggest the existence of a Pb-specific metallothionein, notably in mammals, while others report no induction of metallothionein (MT) by Pb. So far, the potential mechanism of induction of MT by Pb is still poorly understood (Park *et al.*, 2001). To date, no other study reports on Pb-induced MT neither in earthworms nor in other aquatic or terrestrial invertebrates. Only a recent study shows no enhancement of MT-2 expression in the particular earthworm coelomocyte cells exposed to 5.81mg Pb /cm² d.w. on filter paper during 3 days compared to controls (Homa *et al.*, 2005). Some researchers have suggested the use of MTLP to monitor metals contamination (Roesijadi *et al.*, 1994a; Ndayibagira *et al.*, 2007). MTLPs are known for their protection against essential (*i.e.* Zn, Cu) and non-essential metals (*i.e.*

Cd, Hg) toxicity, for their role in metal regulation (Roesijadi *et al.*, 1994b, Klaassen 1995) and for their protection against oxidative stress (Klaassen *et al.*, 1999; Andrew, 2000; Kwang *et al.*, 2008). However, MT synthesis can be induced not only by metals but also by a wide range of endogenous and exogenous factors (Coyle *et al.* 2002; Ndayibagira *et al.* 2003, 2007). Table 1 presents some chemical compounds other than heavy metals known to up- or down-regulate MT expression. Moreover, teratogenicity and decrease of reproduction success are generally associated with a zinc deficiency and maternal MT induction by a wide range of products, *i.e.* arsenic, valproic acid, ethanol, 2-ethylhexanoic acid, melphalan, urethane (Coyle *et al.*, 2002; Ndayibagira *et al.*, 2003). So far, induction of MTLP genes expression after exposure to HMX has not been reported in the literature. However, it can be inferred that HMX could be a potential indirect MTLP inducer, since it has been suggested that HMX could cause oxidative stress (Savard, 2005) and that MTLP induction is a response to oxidative stress (Klaassen, 1999; Andrews, 2000; Kwang *et al.*, 2008). Whatever, MTs in invertebrates tissues shows definite and relevant utility for environmental assessment and monitoring of metals in soil (Dallinger *et al.*, 2004a, 2004b; Lukkari *et al.*, 2004). In a previous study, Ndayibagira *et al.* (2007) suggested to use MTLP concentrations as exposure biomarker to investigate metal exposure on earthworms, in parallel to reproduction endpoint monitoring. Along that line of thought, worm body was dissected into three separated segments (gonads, clitellum and non-reproduction-related tissues) in order to track the mobilization and partitioning of MTLPs and investigate their potential relationships with reproduction effects.

The objectives of this study were: 1) to investigate preferential MTLP accumulation in specific earthworm tissue after Pb and HMX exposure and 2) to investigate the relationships between MTLP concentrations in different tissues and reproduction impairment of earthworms.

3.3 Materials and methods.

3.3.1 Chemicals and Reagents.

Lead nitrate ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (CAS 10099-74-8)) was obtained from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA) and HMX (CAS 2691-41-0), obtained from Produits Chimiques Expro (Valleyfield, QC, Canada). Antipain hypochloride (CAS 37691-11-5), pepstatin A (CAS 26305-03-3), SBD-F (7-Fluorobenzofurazan-4-sulfonic acid ammonium salt, CAS 84806-27-9), TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphine, CAS 51805-45-9), EDTA (CAS 638-92-6), BSA (CAS 9048-46-8), MT-I from rabbit liver (CAS 73767-16-5) and Bradford Reagent were purchased from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA) and from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA). HMX used as reference standard was >99% pure and was obtained from Supelco (Oakville, Ontario, Canada). Trace metal grade water, acetonitrile and methanol were used for HPLC. Deionized water (ASTM, type II) was obtained using a Super Q water purification system (Millipore®) or a Zenopure® Mega-90. Glassware was washed with phosphate-free detergent followed by rinses with water, acetone, nitric acid (10%, v/v), and deionized water.

3.3.2 Earthworms.

The oligochaetes *E. andrei* were obtained from Carolina Biological Supply (Burlington, NC, USA) and were used to establish laboratory cultures. Animals were maintained in earthworm bedding (Magic Products, Amherst Jct, WI, USA) supplemented twice a week with dried cereal (Magic Products, Amherst Jct, WI, USA), at $20 \pm 1^\circ\text{C}$, with $75 \pm 5\%$ humidity and a 16h-light/8h-dark cycle.

3.3.3 Soil characteristics.

The soil was collected at Valcartier CFB (QC, Canada). Soil physical characteristics were: pH 4.4, 98 % sand, 1.7 % silt and 0.3 % clay, 0.30 % moisture, 0.02 % total organic carbon. Total concentrations of metals were low (5.8 mg/kg Ag, 73 mg/kg Ba, 2 mg/kg Co, 12 mg/kg Cr, 67 mg/kg Cu, 310 mg/kg Mn, 8.9 mg/kg Ni, 11 mg/kg Pb, 180 mg/kg Zn, 5600 mg/kg Al, 9 mg/kg B, 16,000 mg/kg Ca, 4800 mg/kg Fe, 2000 mg/kg Mg, 410 mg/kg Na, 77 mg/kg Sr, 120 mg/kg Ti, and 6.2 mg/kg V) or not detected (As, Be, Li, Cd, Mo, Sb, Se, and Sn). The water-holding capacity (WHC = 25.1 mL/100 g) was determined by saturating the soil with water and measuring the water content (Robidoux *et al.*, 2001).

3.3.4. Soil amendment with lead.

Lead was dissolved in deionized water and added to soil. Solutions were prepared to obtain nominal concentrations 0, 25, 50, 100, 200, 400, 750 and 1500 mg Pb/kg soil d.w. At the beginning of experiments, deionized water and Pb solutions was added to get 75 % of the soil WHC. The Pb solution was spiked to the soil in PYREX® 9" x 13" Baking Dish. Soils were kept at 20°C for 48h after spiking before the beginning of the assays. Soils (500g d.w.) were then place in 1-litre Masson Jars and deionized water was used to maintain humidity at 75 % of WHC during the test. Soil samples were collected at days 0, 28 and 56 for Pb analyses.

3.3.5 Soil amendment with HMX.

Acetone was used as vehicle to spike soil with HMX. Solutions were prepared to obtain nominal concentrations 0.15, 0.5, 1.5, 5, 15 and 150 mg HMX/kg soil d.w. The acetone was also used as solvent control. Thus HMX solution was spiked to the soil in PYREX® 9" x 13" Baking dish, and the solvent was allowed to evaporate in

the dark at 20°C in a fume hood. A 2-week evaporation period was allowed to eliminate solvent traces from soil (Robidoux *et al.* 2004a, 2004b, Savard *et al.* 2007). At the beginning of experiments, deionized water was added to get 75 % of the soil WHC. Soils were kept at 20°C for 48h after re-hydration before the beginning of the assays. Soils (500g d.w.) were then placed in 1-litre Masson Jars and deionized water was used to maintain humidity at 75 % of WHC during the test. Soil samples are collected at days 0, 28 and 56 for HMX analysis.

3.3.6 Exposure, sample collection and preparation.

The effects of metal- and explosive-spiked soils on the growth and reproduction of *E. andrei* were assessed using the International Organization for Standardization method (ISO, 1998). Mature worms (with well developed clitellum) were selected (n=320 for Pb and n=280 for HMX exposure), acclimated to clean sandy soil for 24h, then purged 24h from intestinal soil residues on a wet filter paper placed in Petri dishes. Then they were weighed and exposed to soils, in 4 replicates with 10 adults per replicate for each concentration. Water content in soils was adjusted to 75 % of WHC by adding deionized water. Soil humidity was verified by weighing jars every week, and worms were fed with 2 grams of dried cereals during 28 days. Surviving adult earthworms were then collected and purged during 24h, then weighted, frozen in dry ice, spreaded and folded in aluminum foil in order to have access to gonads and clitellum segments. Three worms per replicate were used for the body segmentation experiment. The worms were cut into three portions (gonads, clitellum and non-reproduction-related tissue), then the similar segments were pooled and homogenized as described below. Four of the 7 remaining worms were used for chemical analysis of Cd. The three last worms were kept at -80 °C as an extra sample for additional analyses. After adult withdrawal (day 28), juveniles were fed with 1 gram of dried cereal every week, for a further 28-day period. At day 56, the juveniles and cocoons were collected and counted.

3.3.7 MTLP derivatization and HPLC detection.

As described in Ndayibagira *et al.* (2007), MTLP measurements were performed with 6,183 g boric acid, 1,673 g EDTA (45mM) and 4,5 g KOH reaction buffer in 100 ml zenopure H₂O, pH 10.5 with 5M KOH, kept at 4°C. The segmented compartments were homogenized using a 1:5 ratio (W/V) in a glass-glass homogenizer (Wheaton 7 ml) with homogenization buffer (150mM KCl, 50μM Antipain and 5μM Pepstatin A). Samples (200 μl aliquots) were stored at -80°C until HPLC analysis. Derivatization was performed as described in Ndayibagira *et al.*, 2007. Mobile phase was (K₂HPO₄ 20mM, pH 7.5, ACN (Trace metal grade), MeOH (Trace metal grade) (80:18:2)). Waters Auto sampler 717plus, pump and controller 600, Photodiode Array Detector 2996, Temperature Control Module, Supelco C18 column and waste collector built up the HPLC System. Initial solution of Metallothionein I from rabbit liver was tested for stability before being diluted and used for calibration curve. The following equation was used to obtain MT-I concentration in the vial: $C = D.F. * (OD / \epsilon.l) * MT.M.W.$ where C is the MT-I concentration in mg/ml, D.F. the dilution factor (1:100), O.D. the optic density given by the spectrophotometer, ϵ the molar extinction coefficient, l the quartz cuvette length (one cm across in this case), and MT.M.W. the molecular weight of the MT-I.

3.3.8 Protein content.

Protein contents were determined using Bradford Reagent in 96-well plates (Bradford, 1976). The protein assay was performed either on crude homogenates without heat treatment (dilution factor was 1:10) for total protein measurement or on heat-treated supernatants (no dilution factor). Absorbance at 595 nm was read 5 min after addition of Bradford reagent. Bovine serum albumin (2 mg/ml) was used to prepare the standard curve.

3.3.9 Lead analysis.

Pb was extracted from soil sampled at the beginning ($t = 0$), at mid-term ($t = 28$ d) and at the end ($t = 56$ d) of the experiment. Pb was extracted from earthworm collected at $t=28$ d. Pb content in soil and earthworms tissues were determined by inductively coupled plasma optical mass spectroscopy (ICP-MS) after acid digestion and extraction, following a standardized method (CEAEQ, 2003b). Pb content in the tissues was determined after acid digestion extraction also following a standardized method (CEAEQ, 2003a). The detection limit for Pb measurement in tissue and in soil samples is of 10 mg/kg.

3.3.10 HMX analysis.

HMX concentrations of solutions, soil and tissues were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) (Robidoux *et al.*, 2001; 2002). HMX was extracted from soil sampled at the beginning ($t = 0$), at mid-term ($t = 28$ d) and at the end ($t = 56$ d) of the experiments using a previously described sonication-acetonitrile HPLC method 8330 (USEPA, 1997). The instrumental detection limit for HMX was 34 $\mu\text{g/L}$ so corresponding limits of quantification (LOQ) were 0.29 mg/kg (dry weight) in soil and tissues. HMX concentrations in earthworm tissues were determined after exposure (28 days) using the same method.

3.3.11 Quality control.

The reproduction tests were carried out in quadruplicates and included a negative control (soil added with water only) and solvent controls (soil amended with acetone only). Mortality, growth, reproduction endpoints and other established criteria (*e.g.*, response in the negative control, temperature, and humidity) were verified against in-house control data. The Pb analysis validation was done with

reference soil (TILL-1, TILL-2, TILL-3 and TILL-4) obtained from the Canadian Certified Reference Materials Project (CCRMP, CANMET Mining and mineral Sciences Laboratories, Ottawa, ON, Canada) and tissue standards (DORM-2, DOLT-3 and TORT-2) were obtained from the National Research Council - Institute for National Measurement Standards (NRC-INMS, Ottawa, ON, Canada).

3.3.12 Statistical analysis.

Results were expressed as mean values \pm standard errors deviations (n=4 replicates per treatment) and differences from control and between all pairs were tested with parametric Dunnett's and Tukey-Kramer's tests. Toxicity parameters from the Pb and HMX data sets, as well as the Pb and HMX LC50, EC50, LOEC and NOEC, are determined with the ToxCalc 5.0 software (Tidepool Scientific Software, McKinleyville, CA, U.S.A.). Correlations between reproduction endpoints, Pb/HMX and MTLP concentration in worm compartments, as well as the two Principal Component Analysis (PCAs) were analyzed with JumpIN Software (SAS Institute). Aberrant data were excluded from analysis following an outlier analysis conducted by the software. Each PCA was performed on the standardized data of 11 variables (4 MTLP measurements (whole body and 3 different tissues), 6 life-cycle parameters (5 reproduction endpoints and growth), and tissue metal or explosives concentrations).

3.4 Results.

3.4.1 Toxicant concentrations in soils and tissues.

At the beginning of the exposure, the measured Pb soil concentrations were < 10, 24.5 ± 2.52 , 57.5 ± 2.99 , 98 ± 22.7 , 179 ± 20.0 , 330 ± 65.3 , 620 ± 83.5 mg /kg soil (d.w.), respectively (data not shown), while the soils in the last jars were not analyzed since worms did not survive in (100% mortality at nominal concentration 1500 mg /kg soil d.w.). After 28 days of exposure, the corresponding measured Pb tissue concentrations in whole organism were < 10, 11.5 ± 1.29 , 30.3 ± 5.06 , 73.8 ± 2.22 , 180.8 ± 7.63 , 407.8 ± 80.3 , 545 ± 25.5 $\mu\text{g Pb/g tissue (d.w.)}$, respectively (Figure 1). At the beginning of the exposure, the measured HMX soil concentrations were < 0.25, 0.4 ± 0.1 , 1.4 ± 0.2 , 4.6 ± 0.2 , 13 ± 2 and 141 ± 13 mg /kg soil d.w., respectively (data not shown), while measured HMX tissue concentrations in whole earthworm at the end of the experiment were < 1.0, 1.0 ± 0.1 , 1.0 ± 0.1 , 1.0 ± 0.1 , 2.1 ± 2.7 , 4.0 ± 1.0 and 22 ± 6.5 $\mu\text{g /g tissue (d.w.)}$, respectively (figure 2). HMX was not detected in the solvent control.

3.4.2 Lethality and growth.

Lead was lethal (40% mortality) to adult *E. andrei* at 620 mg/kg soil. The biomass decreased significantly at $\geq 179\text{mg/kg soil (d.w.)}$. While control showed 31.5 ± 10.6 % weight gain, earthworms exposed to ≥ 179 mg Pb /kg showed lower weight change compared to controls (5.5 ± 6.8 %). At the two highest concentrations, earthworms lost weight (-5.4 ± 6.8 % and -28.5 ± 18.2 % at 330 and 620 mg/kg soil respectively). HMX was not lethal to adult earthworms (data not shown). Weight of adult earthworms decreased at ≥ 4.59 mg/kg soil. While earthworms in control jars show a 25.4 ± 9.1 % weight gain, earthworms exposed to 4.6, 13 and 141mg

HMX/kg soil showed less weight gain (7.0 ± 3.9 , 2.2 ± 10.5 and 7.0 ± 12.3 % weight gain, respectively).

3.4.3 MTLP concentrations in Pb-exposed earthworm.

Estimated MTLP concentrations in whole body were similar for all tested Pb soil concentrations (data not shown). Figure 1 illustrates the effects of Pb on the MTLP concentrations in three body compartments of adult earthworm. A striking feature is the high disparity in the basal levels of the three compartments: clitellum has the highest (9.61 ± 0.37 mg/g total proteins), gonads the medium (5.32 ± 0.92 mg/g total proteins) and non-reproductive tissues showed the lowest concentrations (3.03 ± 0.61 mg/g total proteins). Furthermore, a significant decreases was observed at the highest tissue concentration ($407.75 \mu\text{g Pb/g tissue}$) in both gonad (3.23 ± 1.05 mg/g total proteins compared to 5.32 ± 0.92 mg/g total proteins in control) and clitellum sections (7.65 ± 1.49 mg/g total proteins compared to 9.61 ± 0.37 mg/g total proteins in control). A significant differences was also observed in both clitellum (9.06 ± 0.14 mg/g total proteins compared to 9.61 ± 0.37 mg/g total proteins in control) and non-reproductive (2.37 ± 0.09 mg/g total proteins compared to 2.71 ± 0.16 mg/g total proteins in control) at $12 \mu\text{g Pb/g tissue}$.

3.4.4 MTLP concentrations in HMX-exposed earthworm.

Estimated MTLP concentrations in whole body were similar for all tested HMX concentrations (data not shown). Figure 2 shows the effects of HMX on the MTLP concentrations in three body compartments of adult earthworm. Basal levels were also different in the three compartments. Clitellum has the highest (13.4 ± 0.9 mg/g total proteins), gonads the medium (7.9 ± 1.0 mg/g total proteins) and non-reproductive tissue the lowest level (3.6 ± 0.70 mg/g total proteins). Furthermore, MTLP levels significantly decreased in gonad compartment with increasing doses of

toxicant (MTLP concentration of 5.5 ± 0.9 , 4.4 ± 1.2 and 2.1 ± 1.1 mg/g total proteins at 2.09, 3.96 and 21.91 $\mu\text{g HMX/g tissue}$ respectively; basal level in control was 7.92 ± 1.03 mg/g total proteins). On the other hand, a weak but significant induction response of MTLP in non-reproductive tissue after HMX exposure was observed. Indeed, MTLP concentrations were significantly different from control (basal level was 3.58 ± 0.68 mg/g total proteins) at 3.96 ± 0.95 $\mu\text{g HMX/g tissue}$ (MTLP concentration was 4.49 ± 0.47 mg/g total proteins) and at 21.91 $\mu\text{g HMX/g tissue}$ (then MTLP was 4.83 ± 0.49 mg/g total proteins). MTLP levels in clitellum compartment were similar for the different concentrations and showed stable basal levels despite the slightly significant difference at < 0.99 and < 1.07 $\mu\text{g/g tissue}$ (11.05 ± 0.42 and 11.37 ± 0.44 mg/g total proteins, respectively; compared to 13.40 ± 0.92 mg/g total proteins in controls).

3.4.5 Correlations between reproduction parameters, MTLP and Pb concentrations.

Reproduction parameters and growth were significantly correlated with tissue Pb concentrations (Table 2). Significant negative correlations were observed between the tissue Pb concentrations and the number of juveniles ($R^2 = -0.72$; $p < 0.0001$), hatched cocoons ($R^2 = -0.76$; $p < 0.0001$), total cocoons ($R^2 = -0.81$; $p < 0.0001$), hatchability ($R^2 = -0.92$; $p < 0.0001$), juveniles per cocoon ($R^2 = -0.88$; $p < 0.0001$), and growth ($R^2 = -0.87$; $p < 0.0001$). No significant correlations were observed between tissue Pb concentrations and: 1) gonad MTLP concentrations ($R^2 = -0.08$; $p = 0.7091$), 2) clitellum MTLP concentrations ($R^2 = -0.37$; $p = 0.0775$), 3) non-reproductive tissue MTLP concentrations ($R^2 = -0.04$; $p = 0.3665$), and 4) total MTLP concentrations ($R^2 = -0.19$; $p = 0.8425$). Multivariate analysis of Pb data showed only weak correlations between hatchability, as well as juvenile number per produced cocoon, and MTLP concentrations in clitellum portion. R^2 were 0.43 ($p = 0.0459$; $n = 22$) and 0.42 ($p = 0.0534$; $n = 21$), respectively (Table 3).

3.4.6 Correlations between reproduction parameters, MTLP and HMX concentrations.

Reproduction parameters were significantly correlated with HMX tissue concentrations (Table 2). Significant negative correlations were observed between HMX tissue concentration and juveniles ($R^2 = -0.63$; $p=0.0004$), hatched cocoons ($R^2 = -0.60$; $p=0.0011$), total cocoons ($R^2 = -0.56$; $p=0.0022$), hatchability ($R^2 = -0.59$; $p=0.0016$) and juveniles per cocoon ($R^2 = -0.62$; $p=0.0007$). Growth was negatively and weakly correlated with HMX tissue concentrations ($R^2 = -0.45$; $p=0.0174$). Significant and negative correlation was observed between gonad MTLP concentrations and HMX tissue concentrations ($R^2 = -0.79$; $p<0.0001$) while a weaker and positive correlation was observed between non-reproductive tissue MTLP concentrations and HMX tissue concentrations ($R^2 = -0.47$; $p=0.0129$). No significant correlations were observed between HMX tissue concentrations and clitellum MTLP concentrations ($R^2 = -0.03$; $p=0.8825$), and between HMX tissue concentrations and total MTLP concentrations ($R^2 = -0.03$; $p=0.8705$). Multivariate analysis of HMX data showed significant correlations between reproduction endpoints and MTLP concentrations in gonads (positive correlation; Table 3) or in non-reproductive portion (negative correlation; Table 3). The most relevant endpoints that correlated with MTLP concentrations in gonad portion were juveniles, hatched total cocoon numbers with R^2 of 0.77, 0.82 and 0.79 respectively. Others endpoints (*e.g.*, hatchability and number of juveniles per hatched cocoon) also showed significant correlations. The most relevant endpoints that correlated with MTLP concentrations in non-reproductive portion were juveniles, hatched and total cocoon number, with R^2 of -0.54 ($p=0.0042$; $n=26$), -0.55 ($p=0.0033$; $n=26$) and -0.56 ($p=0.0031$; $n=26$) respectively. Correlations with others endpoints (*e.g.*, hatchability and number of juveniles per hatched cocoons) were not significant. Weak but significant correlations have been observed between reproduction endpoints and MTLP concentrations in clitellum portion. No significant correlations have been

observed between reproduction endpoints and MTLP concentrations in whole worm tissue.

3.4.7 Principal components analysis.

The PCA based on Pb exposure and effect data results in two components that explained a total of 74.7 % of the variance, with component 1 contributing to 52.6 % and component 2 contributing to 22.1 %. This indicates that a simple 2-axis structure is adequate to explain the intercorrelations in the Pb data set. The relationships between variables are illustrated in Figure 3. Reproduction parameters were strongly related to the first component. The MTLPs concentrations in various tissues were strongly related to the second component. The Pb Tissue concentration was strongly related to the first component. The PCA based on HMX exposure and effect data results in three components that explained a total of 81.72 % of the variance, with component 1 contributing to 54.31 %, component 2 to 16.40 % and component 3 to 11.01 %. This indicates that a three-axis structure is adequate to explain the intercorrelations in the HMX data set. The relationships between variables are illustrated in Table 4. Most of the reproduction parameters (growth, juveniles, hatched cocoons and total cocoons numbers), tissue HMX concentrations and gonad MTLP concentrations were strongly related to the first component. The MTLPs concentrations in total worm body and in non reproductive tissues were strongly related to the second component, while clitellum MTLP concentrations and the two last reproduction parameters (hatchability and juvenile numbers per cocoons) were strongly related to the third component.

3.4.8 Other observations.

At day 28, a clitellum regression was clearly visible in worms exposed to Pb-spiked soils at 330 and 620 mg/kg soil d.w.

3.5 Discussion.

In this study, Pb was found in tissue/soil ratio of ≤ 1 at 179mg/kg soil d.w. indicating low uptake mechanisms and low potential for bioaccumulation. Earthworms are effectively known to bioaccumulate Pb (Ireland 1975; Morgan and Morgan, 1988; Davies *et al.*, 2003a). Despite this observation, results confirmed that worms are able to tolerate relatively high Pb concentrations, as shown by particularly high LC₅₀ value (LC₅₀ = 579 mg/kg soil d.w., Berthelot *et al.*, 2008). Earthworms tolerate high environmental Pb concentrations because they compartmentalised and accumulated Pb in a nontoxic form (Morgan and Morris 1982; Hopkin, 1989; Morgan *et al.*, 1999; Davies *et al.*, 2003a). The main storage organ in earthworms is the chloragogenous tissue, which consists in modified epithelial cells (chloragocytes) around the posterior alimentary canal. Pb is sequestered by binding with local granules (Morgan *et al.*, 1989). Some studies carried out on those isolated granules (chloragosomes) showed that they accumulate important quantities of Pb (Ireland, 1975, 1978, 1983; Morgan and Morgan, 1989). Then the low potential for bioaccumulation can be explained by the passive diffusion phenomenon. Indeed, Pb is known to penetrate cellular membranes by passive diffusion (Davies *et al.*, 2003a), mainly by the soil solution/dermal route (Vijver *et al.*, 2003).

Concerning toxicity to earthworms, Pb is lethal to *E. andrei* and provokes sublethal effects such as growth and reproduction impairment (Neuhauser *et al.*, 1985; Spurgeon *et al.*, 1994; Spurgeon and Hopkins, 1995; Efroymsen *et al.*, 1997; Savard *et al.*, 2005; 2007). Accumulation of Pb is well-regulated at low soil concentrations, whereas higher soil concentrations (e.g., >5000 mg/kg) are associated with an influx of Pb into the body and the subsequent death of the earthworm (Davies *et al.*, 2003a, Savard *et al.*, 2007). In the present study, LC₅₀ was 579 mg/kg soil d.w. and EC₅₀- growth was 121 mg/kg soil d.w. (Berthelot *et al.*, 2008) confirming that *E. andrei* is a species with relative sensitivity to lead (Bengtsson *et al.*, 1992). The

effects of Pb on reproduction are also well established (Spurgeon *et al.*, 1994; Spurgeon and Hopkin 1995; Efroymsen *et al.*, 1997; Davies *et al.*, 2003b; Savard, 2005). In our study, Pb significantly decreases here the most relevant reproduction parameters (i.e. juvenile number, total cocoons number). The number of cocoons and juveniles are generally the most sensitive reproduction endpoints (Robidoux *et al.*, 2001). Furthermore, significant effects on reproduction were observed at non lethal Pb concentrations (EC_{50} reproduction (total number of cocoons) = 80.8 vs. LC_{50} = 579 mg/kg, Berthelot *et al.*, 2008). These observations confirmed previous studies suggesting that earthworms stressed by metals reduced reproduction and the energy is redistributed for survival mechanisms. Effectively, it has been already reported that, under stress conditions, earthworms enhanced detoxification pathways, DNA damage repair process or mucus production and their productive energy for growth and reproduction is decreased (Spurgeon *et al.*, 1996; Morgan *et al.*, 1999).

However, concerning the effects of Pb exposure on earthworm MTLP, segmentation did not reveal any significant MTLP induction compared to controls. Consequently, no significant correlation has been observed between reproduction endpoints and MTLP concentrations in worm compartments or estimated total MTLP levels after 28 days of exposure to Pb. This observation supports the following hypothesis: 1) Pb did not induce MTLP over basal concentrations and a Pb-specific MTLP is absent in *E. andrei* as described by Homa *et al.* (2005). Pb is effectively known to have a high affinity for MT *in vitro* (Waalkes *et al.*, 1984) but binds only sparingly *in vivo* (Waalkes and Klaassen, 1985). Lead is also categorized as indirect MT inducers since it induces MT *in vivo* but not *in vitro* (Park *et al.*, 2001); 2) A limited MTLP induction over basal concentration remains undetectable. A previous *in vivo* study showed that low Pb concentration caused only a partial Zn release although excess of these ions succeed to lead to total displacement (Nielson *et al.*, 1985). Then a lack of displacement of physiological MT-bound-Zn by the bioaccumulated lead will result in a limited synthesis of new MTLP mRNA in the

present study, so that total MTLPS quantities may not be strongly increased (Nielson *et al.*, 1985). It is well known that Zn displacement is an important aspect of MT induction (Klaassen *et al.*, 1995; Klaassen *et al.*, 1999); 3) MTLPS are induced but are not stable as demonstrated by Ikebuchi *et al.* (1986) in rat liver. This study dealt with the inductive synthesis of a Pb-MT in the liver of rats given a sublethal dose of lead acetate. Interestingly, this Pb-MT was unstable, gradually released Pb during the isolation and was degraded. This might be the reason why induction of this protein by Pb was not observed in other studies. The MTLPS degradation and the release of Pb may have happen in *E. andrei* and, consequently, the newly formed MTLPS might not be detected after 28 days in earthworms; 4) Pb is mainly stocked in a non-toxic form in the chloragocytes and MTLPS responses were not observable. Furthermore, we noted significant decreases from controls at the highest tissue Pb concentration (407.8 µg/g tissue) in both gonad and clitellum sections. These decreases may be explained by indirect effects of Pb on reproductive elements, obviously caused by an important cell death at high concentration. Finally, the absence of correlation between MTLPS and tissue Pb concentration in the present study is consistent with a weak affinity for MT *in vivo* (Waalkes *et al.*, 1984), Pb-MTLPS instability (Ikebuchi *et al.*, 1986) or a lack of Zn displacement by Pb (Nielson *et al.*, 1985).

Interestingly, significant decreases of MTLPS concentrations at a low Pb dose (12 µg Pb/g tissue), in both earthworms clitellum and non-reproductive tissue were observed. Similarities between these observations and a phenomenon called hormesis were found. Hormesis is a dose-response phenomenon characterized by low dose stimulation, high dose inhibition, and resulting in an inverted J- or U-shaped dose response curve (Calabrese, 2004). Hormesis is a generally-favourable biological responses to low exposures to toxins and others stressors. It is conjectured that a low dose of toxin may trigger certain repair mechanisms. These initiated mechanisms could be efficient enough to neutralize the toxin's effect, but even to repair other defects. (Calabrese, 2004). However, the dose response curve in the present study can

be described as ‘‘non-reverted U- or a J-shaped’’, mainly because MTLPs are induced upon a stress. While some cases of hormesis show low doses of toxicants showing beneficial effects (Steevens *et al.*, 2001), others show effectively profoundly adverse effects (Vom Saal *et al.*, 2005). Consequently, hormesis should be characterized by low doses that show the opposite effect of high doses. Thus, a decrease in MTLP could be an early indicator of effect in earthworm. The hormesis model of dose response is still vigorously debated (Kaiser, 2003; Calabrese, 2004)

PCA based on Pb data confirmed the presence of strong correlations only between the tissue Pb concentrations and reproduction parameters while no significant correlations were observed between MTLP concentrations and tissue Pb concentrations or reproduction parameters. PCA also successfully reduced overall information of Pb data set, providing a simple and unique 2-axis structure to assess the full set of parameters. Our results confirm that PCA is a good statistical tool to easily and rapidly investigate relationships between parameters, toxicant concentrations and biochemical indicators as previously described (Astley *et al.*, 1999; Burger *et al.*, 2000; Perceval *et al.*, 2002; Galay-Burgos *et al.*, 2005; Rose *et al.*, 2006).

HMX uptake by earthworms occurs but tissue/soil concentration ratios were <1.0 , indicating very low potential for bioaccumulation. Indeed low bioaccumulative potential of this weakly hydrophobic compound was already observed in aquatic organism by Lotufo and Lydy (2005) and Rosen and Lotufo (2007). Kinetically derived BCFs (bioconcentration factors) were 0.5 and 0.44 ml g^{-1} for HMX in fish sheepshead minnows (Lotufo *et al.*, 2005) and in marine mussel *Mytilus galloprovincialis* (Rosen *et al.*, 2007), respectively. Comparison of HMX concentrations at the beginning and the end of the experiment revealed no significant degradation of HMX during the exposure period.

HMX was not lethal ($LC_{50} > 141$ mg/kg soil d.w., Berthelot et al., 2008), but reduced significantly the body weight ($EC_{50} = 2.2$ mg/kg soil d.w., Berthelot et al., 2008), similarly to previous studies (Phillips *et al.*, 1993; Robidoux *et al.*, 2000 to 2004b; Savard, 2005). HMX also significantly decreased the reproductive functions, *i.e.* number of produced cocoons and juveniles (Robidoux *et al.*, 2002a; 2002b; Simini *et al.*, 2004a; 2004b). EC_{50} -reproduction (total number of cocoons) of HMX in the sandy soil is estimated to 9.1 mg/kg soil d.w. (Berthelot et al., 2008). Furthermore, strong and significant correlations were observed between HMX tissue concentrations and reproduction endpoints confirming that reproduction endpoints as well as tissue concentrations are adequate to assess effects of HMX exposure (Robidoux *et al.*, 2000b, 2001, 2002; Simini *et al.*, 2004b). Moreover, HMX is definitively more toxic than Pb in soils, with respect to reproduction parameters (Savard *et al.*, 2007).

Concerning the effects of HMX on earthworm total MTLPs, the induction were not significant compared to controls. However, segmentation reveals that MTLP contents in gonads and in non-reproduction-related tissue seem to be differently affected by this toxicant, while no significant MTLP induction was observed in clitellum. Results showed a decrease of MTLPs in gonads and a weak increase in the other tissue in a dose-dependent manner that correlated with HMX tissue concentrations. This study is the first time that effects of HMX on MTLPs in earthworm are observed. Statistical relationships between reproduction impairment and MTLP concentrations in gonad portion and in non-reproductive tissues suggest a mechanism to protect the organism survival at the expense of the reproduction function and could confirm the implication of MTLP in the cell protection against oxidative stress (Roesijadi, 1994a; Klaassen, 1995; Andrews, 2000; Kwang *et al.*, 2008). In the known HMX biodegradation pathways, HMX effectively acts as an electron acceptor and could then be considered as an oxidant (Crocker et al., 2006). Such MTLP decrease and increase within the organism may effectively be a strategy

to allow survival, as observed previously with Pb. Consequently, worms can detect and withstand HMX presence, avoid pollution, and to delay the offspring production until the condition become favorable. It is an efficient defense mechanism to overcome acute toxicity when reproduction is impaired. Such increase in non-reproductive tissue and decrease in gonad portions can be explained by a change in the energy budget occurring in earthworms when exposed to HMX. The proportion of energy available for maintaining reproduction processes (e.g. indirect MTLPs induction and binding/neutralization of toxicant near reproduction-related tissues) is effectively decreased because adaptation efforts (e.g., avoidance and general detoxification of contaminants, particularly a MTLPs response) require additional energy expenditures (Spurgeon *et al.*, 1996; Morgan *et al.* 1999). The decrease in MTLP from the gonads could also be explained by tissue atrophy or a destruction of the gonads caused by the HMX ("cell death mechanism").

PCA based on HMX data confirmed the presence of strong correlations only between the tissue HMX concentrations, reproduction parameters and the gonad MTLP concentrations. PCA also successfully reduced the essential of the information of the HMX data set, providing a simple and unique 3-axis structure, then confirming PCA is a good visual statistical tool in multimarker ecotoxicologic assays, as seen with Pb data and as described previously (Astley *et al.*, 1999; Burger *et al.*, 2000; Perceval *et al.*, 2002; Galay-Burgos *et al.*, 2005; Rose *et al.*, 2006).

Use of biomarkers gives the advantage of a sensitive and discriminant tool to assess toxicant exposure (Lagadic *et al.*, 1998; Svendsen *et al.*, 2002; Gagné and Blaise, 2005; Ndayibagira *et al.*, 2007). If MTLP measurements offer a great potential to assess some metal exposure (e.g. Cd, Zn, Cu,...) and their early biological effects (Roesijadi, 1994a; Gagné and Blaise, 2005; Ndayibagira *et al.*, 2007), it is useless to consider MTLP measurement in case of Pb exposure. Effectively, Pb has no observable or direct effect on MTLP concentrations in *E. andrei*. However, we

observed some indirect effects, most likely caused by cell death or hormesis. Previous works also reinforce the notion that the value of biomarkers is higher when they are employed as suites rather than individually (Lukkari *et al.*, 2004; Homa *et al.*, 2005). Effectively, a battery of biomarkers is often used to evaluate the effects of exposure to chemical contaminants and detect responses to environmental stress (Beliaff and Burgeot, 2002; Galloway *et al.*, 2004; Berthelot *et al.*, 2008; 2009). Berthelot *et al.* (2009) recently assessed RTA soil quality using a large multimarker approach. Selected variables for model derivation effectively were: (1) soil physico-chemical properties (sand, silt and clay content, pH, Total Organic Carbon [TOC], amorphous iron and aluminium oxide contents [Fe_{ox} and Al_{ox}]), (2) total soil contaminant concentrations of the contaminated soil samples, at the beginning of the exposure (Bi, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn, as well as HMX), (3) bioaccessible metal and soluble HMX levels at the beginning of the exposure, measured in aqueous soil extracts, (4) metal concentrations in earthworm tissue after 28 days of exposure and, (5) selected biomarkers (Neutral Red Retention Time [NRRT], Catalase [CAT], Superoxide dismutase [SOD], Glutathione S-Transferase [GST] and Acid Phosphatase [AP]) assessed after 2, 7 and 28 days of exposure. Consequently, a multi-marker approach including MTLP measurements would be a useful tool for contaminated RTA assessment.

3.6 Conclusion.

This study confirms that HMX and Pb are uptaken by earthworms *E. andrei* (very low uptake in case of HMX) and affects their growth and reproductive functions. Soil characteristics are important in toxicity test using *E. andrei*, since toxicity was higher in the sandy soil used in the present study. Using measurements in the whole earthworm body, no significant differences in MTLP concentrations between doses was observed after exposure to HMX and Pb, suggesting those toxicants cannot induce significant or measurable quantities of MTLPs. However earthworm body segmentation in three different portions allowed observation of an underlying mechanism in the earthworm, occurring upon HMX exposure (most likely a cell death induced by HMX) and that was unobservable measuring in whole body. Then MTLP concentration measurements in earthworm tissues seem to possess very limited ability for Pb. However, the MTLPs can be affected by HMX. Considering the multiple contamination in RTA (*i.e.* metals and energetic substances), unknown or misunderstood response of earthworm MTLPs to toxicants (e.g. Cu, Cr, Nitroglycerine...) should be investigated.

3.7 Acknowledgments.

We thank André Marois from Defence Research and Development Canada – Valcartier (DRDC-Valcartier, Canadian Ministry of National Defence) for soil collecting at Valcartier CFB (QC). We are also grateful Drs. Sonia Thiboutot and Guy Ampleman from DRDC-Valcartier, for their support. Gratitude is also expressed to Louise Paquet from the Environmental Chemistry Group as well as Manon Sarrazin, Virgine Bérubé, Dr. Geoffrey Sunahara and all the Applied Ecotoxicology Group, Biotechnology Research Institute – National Research Council of Canada for technical assistance and scientific advice.

3.8 References:

- Andrews, G. K. 2000. "Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions". *Biochem. Pharmacol.*, vol. 59, no. 1, p. 95-104.
- Astley, K. N., H. C. Meigh, G. A. Glegg, J. Braven et M. H. Depledge. 1999. "Multivariate analysis of biomarker responses in *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas* from the Tees estuary (UK)". *Mar. Poll. Bull.*, vol. 39, no. 1, p. 145-154.
- Beliaeff, B. et T. Burgeot. 2002. "Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment". *Environ. Tox. Chem.*, vol. 21, no. 6, p. 1316-1322.
- Bengtsson, G., H. Ek et S. Rudgren. 1992. "Evolutionary response of earthworms to long term metal exposure". *Oikos*, vol. 63, p. 289-297.
- Berthelot, Y. 2008. "Évaluation de la biodisponibilité des métaux et des matériaux énergétiques dans les sols provenant de sites d'entraînement militaire". Thèse présentée comme exigence partielle au doctorat en sciences de l'environnement. Université du Québec à Montreal, Montréal, Québec.
- Berthelot Y., B. Trottier et P.-Y. Robidoux. 2009. "Assessment of soil quality using bioaccessibility-based models and a biomarker index". *Environ. Inter.*, vol. 35, no. 1, p. 83-90.
- Bradford, M. M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical Biochemistry*, vol. 72, p. 248-254.
- Burger, J., C. G. Lord, E. J. Yurkow et L. McGrath. 2000. "Metals and metallothionein in the liver of raccoons : utility for environmental assessment and monitoring". *Journal of Toxicology and Environmental Health*, vol. 60A, p. 243-261.
- Calabrese, E. 2004. "Hormesis: a revolution in toxicology, risk assessment and medicine". *EMBO*, vol. 5, p. S37-S40.
- CEAEQ - Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec. 2003a. "Détermination des métaux dans les tissus animaux : méthode par spectrométrie d'émission au plasma d'argon après minéralisation acide". method MA 207-Met1.0. Québec, QC, Canada.
- CEAEQ - Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec. 2003b. "Spectrométrie de masse à source ionisante au plasma d'argon". Method MA 200-met1.1. Québec, QC, Canada.
- CCME - Canadian Council of Ministers of the Environment. 2006. "Canadian soil quality guidelines for the protection of environmental and human health: Summary tables". Updated in November 2006. In: *Canadian Environmental Quality Guidelines*, 1999, Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg, Manitoba, Canada.

- Coyle, P., J. C. Philcox, L. C. Carey et A. M. Rofe. 2002. "Metallothionein: the multipurpose protein". *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 59, p. 627-647.
- Crocker, F. H., K. J. Indest et I.-I. L. Fredrickson. 2006. "Biodegradation of the cyclic nitramine explosives RDX, HMX, and CL-20". *Appl. Microbiol. Biot.*, vol. 73, p. 274-290.
- Dallinger, R., M. Chabicozsky, B. Lagg, R. Schipflinger, H. G. Weirich et B. Berger. 2004a. "Isoform-specific quantification of metallothionein in the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. II. A differential biomarker approach under laboratory and field conditions". *Environ. Tox. Chem.*, vol. 23, no. 4, p. 902-910.
- Dallinger, R., B. Lagg, M. Egg, R. Schipflinger et M. Chabicozsky. 2004b. "Cd accumulation and Cd-metallothionein as a biomarker in *Cepea hortensis* (Helicidae, Pulmonata) from laboratory exposure and metal-polluted habitats". *Ecotoxicology*, vol. 13, p. 757-772.
- Davies, N., M. Hodson et S. Black. 2003a. "The influence of time on lead toxicity and bioaccumulation determined by the OECD earthworm toxicity test". *Environ. Poll.*, vol. 121, p. 55-61.
- Davies, N., M. Hodson et S. Black. 2003b. "Is the OECD acute worm toxicity test environmentally relevant? The effect of mineral form on calculated lead toxicity". *Environ. Poll.*, vol. 121, p. 49-54.
- Efroymson, R. A., M. E. Will, G. W. Suter II. 1997. "Toxicological benchmarks for contaminants of potential concern for effects on soil and litter invertebrates and heterotrophic process: 1997 Revision". Report Es/ER/TM-126/R2. Oakridge National Laboratory, Oakridge, Tennessee, USA.
- Gagné, F. et C. Blaise. 2005. "Review of biomarkers and new techniques for in situ aquatic studies with bivalves". In: *Environmental toxicity testing*. K.C. Thompson, K. Wadhia and A.P. Loibner (eds). Oxford (UK): Blackwell publishing, and Boca Raton (USA) : CRC Press. P. 206-228.
- Galay-Burgos, M., C. Winters, S. R. Stürzenbaum, P. F. Randerson, P. Kille et A. J. Morgan. 2005. "Cu and Cd effects on the earthworm *Lumbricus rubellus* in the laboratory: Multivariate statistical analysis of relationship between exposure, biomarkers and ecologically relevant parameters". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, p. 1757-1763.
- Galloway, T. S., R. J. Brown, M. A. Browne, A. Dissanayake, D. Lowe, M. B. Jones et M. H. Depledge. 2004. "A multi-biomarker approach to ecosystem management" *Environ. Sci. Technol.*, vol. 38, p. 1723-1731.
- Homa, J., E. Olchawa, S. R. Stürzenbaum, A. J. Morgan et B. Plytycz. 2005. "Early-phase immunodetection of metallothionein and heat shock proteins in extruded earthworm coelomocytes after dermal exposure to metal ions". *Environ. Poll.*, vol. 135, p. 275-280.
- Hopkin, S. P. 1989. *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates*. Oxford (UK): Elsevier applied science. 366p.

- Ikebuchi, H., R. Teshima, K. Suzuki, T. Terao et Y. Yamane. 1986. "Simultaneous induction of Pb-metallothionein-like protein and Zn-thionein in the liver of rats given lead acetate". *Biochem. J.*, vol. 233, p. 541-546.
- Ireland, M. P. 1975. "Distribution of lead, Zinc and calcium in *Dendrobaena rubida* (oligochaete) living in soil contaminated by base metal mining in Wales". *Comp. Biochem. Physiol. B.*, vol. 52, p. 551-555.
- Ireland, M. P. 1978. "Heavy metal binding proprieties of earthworm chloragosomes". *Acta. Biol. Acad. Sci. Hung.*, vol. 29, no. 4, p. 385-395.
- Ireland, M. P. 1983. "Heavy metal uptake and tissue distribution in earthworm". In: *Earthworm ecology from Darwin to vermiculter*. J. E. Satchell (eds). London (UK): Chapman and Hall. p. 247-265.
- ISO. 1998. "Soil quality - Effect of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction". ISO 11268-2. International Organisation for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Kaiser, J. 2003. "Hormesis: Sipping From a Poisoned Chalice." *Science*, vol. 302, no. 5644, p. 376-379.
- Klaassen, C. D. 1995. *Casarett and Doull's toxicology : The basic science of poisons*. 5th edition. New York (USA): McGraw-Hill. 912p.
- Klaassen, C. D., J. Liu et S. Choudhuri. 1999. "Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 39, p. 267-294.
- Kuperman, R. G., R. T. Checkai, M. Simini, C. T. Phillips, J. E. Kolakowski, C. W. Kurnas et G. I. Sunahara. 2004. "Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeida) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX". *Pedobiologia*, vol. 47, p. 651-656.
- Kwang, W. A., H. S. Shin, C. Y. Choi. 2008. "Physiological responses and expression of metallothionein (MT) and superoxide dismutase (SOD) mRNAs in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to benzo[a]pyrene". *Comp. Biochem. Physiol. B.*, vol. 149, no. 3, 534-539.
- Lachance, B., P.-M. Bergeron, V. Bérubé, G. I. Sunahara et P.-Y. Robidoux. 2008. "Validation of environmental military threshold values for explosives in soil". Report CNRC #49926. National Defence, Ottawa, ON, and NRC-BRI, Montréal, Québec.
- Lagadic, L., J.-C. Amiard, T. Caquet et F. Ramade. 1998. "Biomarqueurs et évaluation de l'impact écologique des polluants". In: *Utilisation des biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*. L. Lagadic, T. Caquet, J. C. Amiard and F. Ramade (eds). Paris (France) : Lavoisier. p. 299-307.

- Lotufo, G. R. et M. J. Lydy. 2005. "Comparative toxicokinetics of explosive compounds in sheepshead minnows". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 49, no. 2, p. 206-214.
- Lukkari, T., M. Taavitsainen, M. Soimasuo, A. Oikari et J. Haimi. 2004. "Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* to copper and zinc exposure: differences between populations with and without earlier metal exposure". *Environ. Poll.*, vol. 129, p. 377-386.
- Marois, A., A. Gagnon, S. Thiboutot, G. Ampleman, M. Bouchard. 2004. "Caractérisation des sols de surface et de la biomasse dans les secteurs d'entraînements, Base des Forces Canadiennes, Valcartier". Report DRDC-VALCARTIER-TR-2004-206. Defense R&D Canada, Valcartier, QC, CA.
- Morgan, A. J. et B. Morris. 1982. "The accumulation and intracellular compartmentation of cadmium, lead, zinc and calcium in two earthworm species (*Dendrobaena rubida* and *Lumbricus rubellus*) living in highly contaminated soil". *Histochemistry*, vol. 75, p. 269-285.
- Morgan, J. E. et A. J. Morgan. 1988. "Earthworms as biological monitors of cadmium, copper, lead and zinc in metalliferous soils". *Environ. Poll.*, vol. 54, p. 123-138.
- Morgan, J. E. et A. J. Morgan. 1989. "The effect of lead incorporation on the elemental composition of earthworm (Annelida, Oligochaeta) chloragosome granule." *Histochemistry* **92**: 237-241
- Morgan, A. J., S. R. Stürzenbaum, C. Winters et P. Kille. 1999. "Cellular and molecular aspects of metal sequestration and toxicity in earthworms". *Invertebrate reproduction and development.*, vol. 36, no. 1-3, p. 17-24.
- Ndayibagira, A., N. Ait Ali, Y. Berthelot, S. Thiboutot, G. Ampleman, G. I. Sunahara et P.-Y. Robidoux. 2003. "Métallothionéine chez les vers de terre: Biomarqueurs de la biodisponibilité des métaux lourds". Chapitre Saint Laurent 2003 presentation, Montreal, Québec, Canada.
- Ndayibagira, A., G. I. Sunahara et P.-Y. Robidoux. 2007. "Rapid isocratic HPLC quantification of metallothionein-like proteins as biomarkers for cadmium exposure in the earthworm *Eisenia andrei*". *Soil. Biol. Biochem.*, vol. 39, p. 194-201.
- Neuhauser, E. F., R. C. Loehr, D. L. Milligan et D. L. Malecki. 1985. "Toxicity of metals to the earthworm *Eisenia andrei*". *Biol. Fert. Soils.*, vol. 1, p. 149-152.
- Nielson, K. B., C. L. Atkin et D. R. Winge. 1985. "Distinct Metal-binding Configurations in Metallothionein". *J. Biol. Chem.*, vol. 260, p. 5342-5350.
- Park, J. D., Y. Liu et C. D. Klaassen. 2001. "Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and others metals". *Toxicology*, vol. 163, p. 93-100

- Perceval, O., B. Pinel-Alloul, G. Méthot, Y. Couillard, A. Giguère, P. G. C. Campbell et L. Hare. 2002. "Cadmium accumulation and metallothionein synthesis in freshwater bivalves (*Pyganodon grandis*): relative influence of the metal exposure gradient versus limnological variability". *Environ. Poll.*, vol. 118, p. 5-17.
- Phillips, C. T., R. T. Checkai et R. S. Wentsel. 1993. "Toxicity of selected munitions and munition-contaminated soil on the earthworm (*Eisenia andrei*)". Report ERDEC-TR-037, U.S. Army Chemical and Biological Defense Agency, Aberdeen Proving Ground, Maryland, USA.
- Robidoux, P.-Y., G. Bardai, M. Sarrazin, L. Paquet, P. Gong, J. Hawari et G. I. Sunahara 2000a. "Ecotoxicological risk assessment of an antitank firing range contaminated with explosives". NRCC Report #43317. National Research Council, Biotechnology Research Institute, Montreal, Québec. 64p
- Robidoux, P.-Y., C. Svendsen, J. Caumartin, J. Hawari, G. Ampleman, S. Thiboutot, J. M. Weeks et G. I. Sunahara 2000b. "Chronic toxicity of energetic compounds in soil using the earthworm (*Eisenia andrei*) reproduction test". *Environ. Tox. Chem.*, vol. 19, p. 1764-1773.
- Robidoux, P.-Y., J. Hawari, S. Thiboutot, G. Ampleman et G. I. Sunahara. 2001. "Chronic toxicity of octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX) in soil determined using the earthworm (*Eisenia andrei*) reproduction test". *Environ. Poll.*, vol. 111, p. 283-292.
- Robidoux, P.-Y., J. Hawari, G. Bardai, L. Paquet, G. Ampleman, S. Thiboutot et G. I. Sunahara. 2002. "TNT, RDX and HMX decrease earthworm (*Eisenia andrei*) life-cycle responses in a spiked natural forest soil". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 43, p. 379-388.
- Robidoux, P.-Y., C. Dubois, J. Hawari et G. I. Sunahara. 2004a. "Assessment of soil toxicity from an antitank firing range using *Lumbricus terrestris* and *Eisenia andrei* in mesocosms and laboratory studies". *Ecotoxicology*, vol. 13, p. 603-614.
- Robidoux, P.-Y., P. Gong, M. Sarrazin, G. Bardai, L. Paquet, J. Hawari, C. Dubois et G. I. Sunahara. 2004b. "Toxicity assessment of contaminated soils from antitank firing range". *Ecotox. Environ. Safe.*, vol. 58, p. 300-313.
- Robidoux, P.-Y., B. Lachance, L. Didillon, F.-O. Dion et G. I. Sunahara. 2006. "Development of ecological and human health preliminary soil quality guidelines for energetic materials to ensure training sustainability of canadian forces". NRCC report # 45936. NRC- BRI, Montréal, Québec.
- Roesijadi, G. 1994a. "Metallothionein induction as a measure response to metal exposure in aquatic animals". *Environ. Health. Perspect.*, vol. 102, no. 12, p. 91-96.
- Roesijadi, G. 1994b. "Metallothionein and its role in toxic metal regulation". *Comp. Biochem. Physiol. C.*, vol. 113, no. 2, p. 117-123.

- Rose, W. L., R. M. Nisbet, P. G. Green, S. Norris, T. Fan, E. H. Smith, G. N. Cherr et S. L. Anderson. 2006. "Using an integrating approach to link biomarker responses and physiological stress to growth impairment of cadmium-exposed larval topsmelt". *Aquatic Toxicol.*, vol. 80, p. 298-308.
- Rosen, G. et G. R. Lotufo. 2007. "Bioaccumulation of explosive compounds in the marine mussel, *Mytilus galloprovincialis*". *Ecotox. Environ. Safe.*, vol. 68, no. 2, p.237-245.
- Savard, K. 2005. "Evaluation des effets d'une exposition simultanée à des composés polynitro-organiques et certains métaux chez le ver de terre". Mémoire de Maîtrise. Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec. 129 p.
- Savard, K., Y. Berthelot, A. Auroy, P. A. Spear, B. Trottier et P.-Y. Robidoux. 2007. "Effects of HMX-lead mixtures on reproduction of earthworm *Eisenia andrei*". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 53, no. 3, p. 341-358.
- Simini, M., R. T. Checkai, R. G. Kuperman, C. T. Phillips, J. E. Kolakowski, C. W. Kurnas et G. I. Sunahara. 2004a. "Reproduction and survival of *Eisenia andrei* in a sandy loam soil amended with nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX". *Pedobiologia*, vol. 47, p. 657-662.
- Simini, M., R. T. Checkai, R. G. Kuperman, C. T. Phillips, J. E. Kolakowski, C. W. Kurnas et G. I. Sunahara. 2004b. "Toxicity of RDX, HMX, 2,4-DNT and 2,6-DNT to the earthworm *E.andrei* in a sandy loam soil". Technical Report ECBC-TR-467. U.S. Army, Edgewood Chemical and Biological Center, Aberdeen Proving ground, MD.
- Spurgeon, D. J., S. P. Hopkin et D. T. Jones. 1994. "Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): Assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems". *Environ. Poll.*, vol. 84, p. 123-130.
- Spurgeon, D. J. et S. P. Hopkin. 1995. "Extrapolation of the laboratory-based OECD earthworm toxicity test to metal-contaminated field sites". *Ecotoxicology*, vol. 4, p. 190-205.
- Spurgeon, D. J. et S. P. Hopkin. 1996. "Effects of metal contaminated soils to the growth, sexual development, and early cocoon production of the earthworm *Eisenia fetida*, with particular reference to Zinc". *Ecotox. Environ. Safe.*, vol. 35, p. 86-95.
- Spurgeon, D. J., S. R. Stürzenbaum, C. Svendsen, P. K. Hankard, A. J. Morgan, J. M. Weeks and P. Kille. 2004. "Toxicological, cellular and gene expression responses in earthworms exposed to copper and cadmium". *Comp. Biochem. Biophysiol. C.*, vol. 38, p. 11-21.
- Steevens, J. A., B. M. Duke, G. R. Lotufo et T. S. Bridges. 2001. "Toxicity of the explosives 2,4,6-trinitrotoluene, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine, and Octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine in sediments to *Chironomus tentans* and *Hyalella azteca*: low-dose hormesis and high-dose mortality". *Environ. Toxicol. Chem.*, vol 21, no. 7, p. 1475-1482.

- Svendsen, C., G. Paton et J. M. Weeks. 2002. "Soil biomarkers (invertebrates and microbes) for assessing site toxicity". In: *Environmental analysis of contaminated sites*. G. I. Sunahara, A. Y. Renoux, C. I. Thellen, C. I. Gaudet and A. Pilon (eds). Toronto (ON): Wiley Canada. 490p
- Thiboutot, S., G. Ampleman, A. Marois, A. Gagnon, M. Bouchard, A. Hewitt, T. Jenkins, M. Walsh, K. Bjella, C. Ramsey, T. A. Ranney. 2004. "Environmental conditions of surface soils, CFB Gagetown Training area : Delineation of the presence of munitions related residues (Phase III, final report)". Report DRDC-VALCARTIER-TR-2004-205. Defense R&D Canada, Valcartier, QC, CA and Cold Region Research and Engineering Lab, Hanover, NH, USA.
- USEPA. 1997. "Method 8330, Nitroaromatics and Nitramines by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), test methods for evaluating solid wastes". Office of Solid Wastes, Washington D.C., USA
- Vijver, M. G., J. P. M. Vink, C. J. H. Miermans et C. A. M. Van Gestel. 2003. "Oral sealing using glue: a new method to distinguish between intestinal route and dermal uptake of metals in earthworms". *Soil. Biol. Biochem.*, vol. 35, p. 125-132.
- Vom Saal, F. S., S. C. Nagel, B. G. Timms et W. V. Welshons. 2005. "Implications for human health of the extensive bisphenol A literature showing adverse effects at low doses: A response to attempts to mislead the public". *Toxicology*, vol. 212, no. 2-3, p. 244-252.
- Waalkes, M. P., M. J. Harvey et C. D. Klaassen. 1984. "Relative *in vitro* affinity of hepatic metallothionein for metals". *Toxicology Letters*, vol. 20, no. 1, p. 33-39.
- Waalkes, M. P. et C. D. Klaassen. 1985. "Concentration of metallothionein in major organs of rats after administration of various metals". *Fundamental and applied toxicology*, vol. 5, p. 473-477.

3.9 Figure Captions.

Figure **3.1** Effect of Pb concentration on MTLP concentrations in *E. andrei* body compartments after 28 days of exposure.

Figure **3.2** Effect of HMX concentration on MTLP concentrations in *E. andrei* body compartments after 28 days of exposure.

Figure **3.3** Principal Component analysis on data obtained after Pb exposure: Varimax rotation and Kaiser normalisation for each variable.

3.10 Table index.

Table **3.1** Effects of organic compounds on MT accumulation or induction.

Table **3.2** Correlations between parameters and Pb/HMX tissue concentrations in *Eisenia andrei*.

Table **3.3** Correlations between reproduction endpoints and MTLP concentrations in the three body compartments and in whole worm tissue.

Table **3.4** Principal Component analysis on data obtained after HMX exposure.

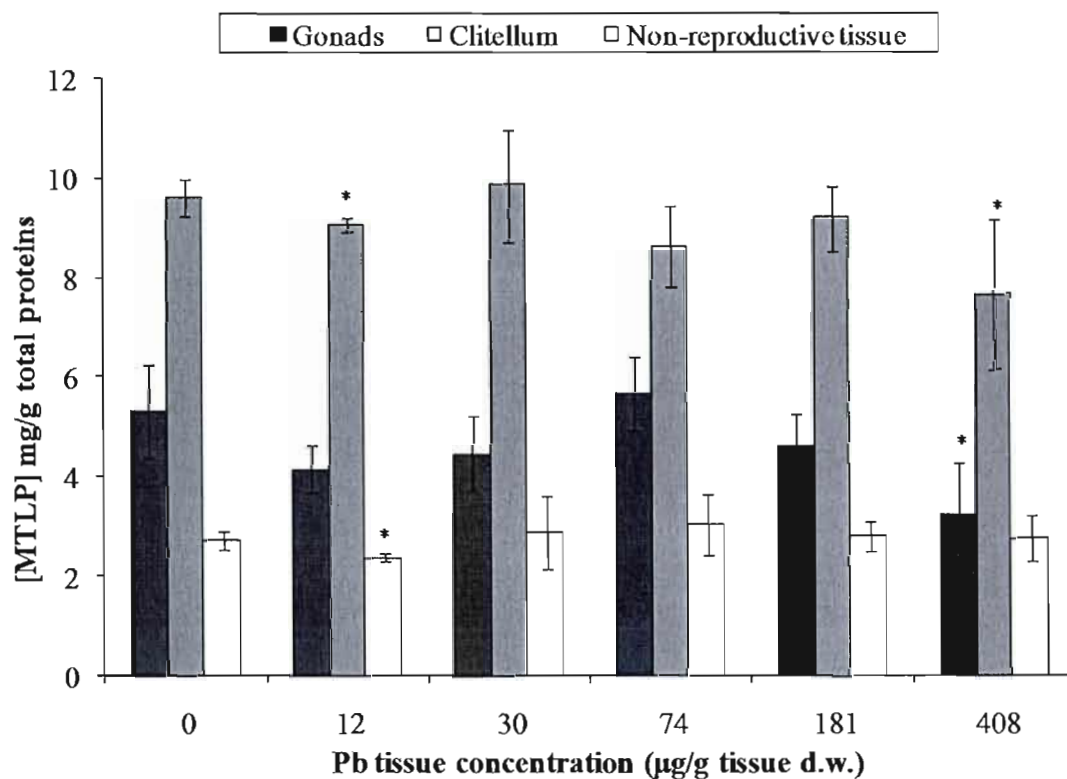


Figure 3.1 Effect of different Pb concentrations on MTLP concentration in *E.andrei* compartments after 28 days of exposure.

Note, X-bars are standard deviation. Stars (*) represent significant difference compared to controls (Dunnett's, $n=4$, $p<0.05$)

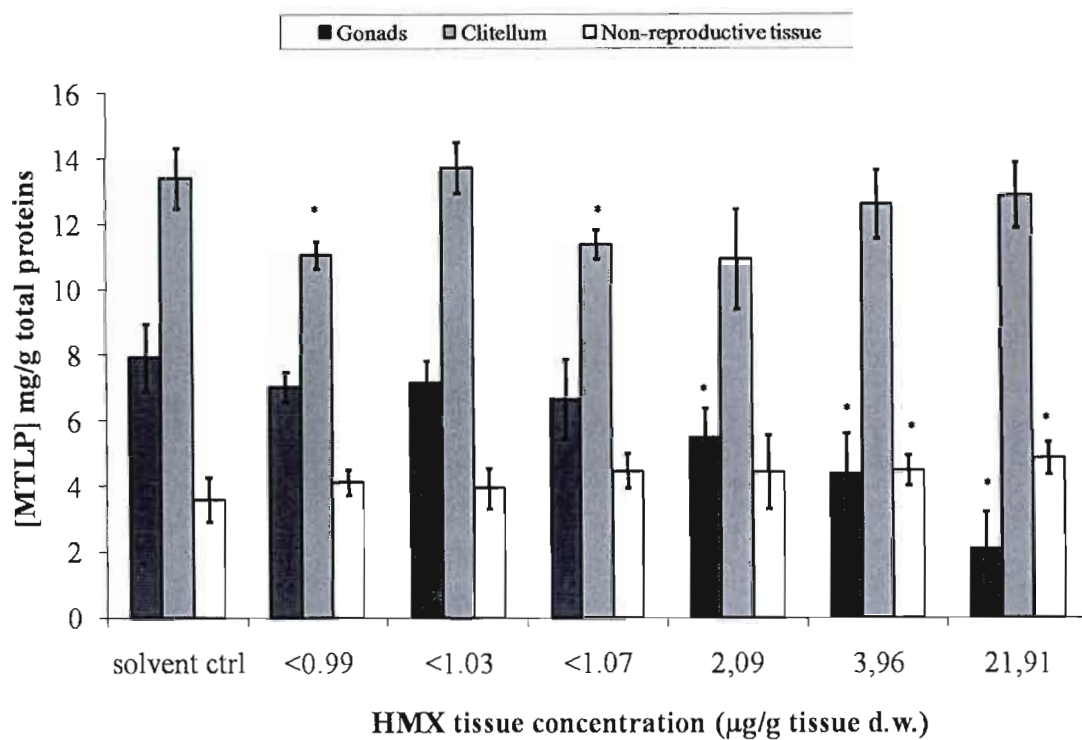


Figure 3.2 Effect of different HMX concentrations on MTLP concentration in *E. andrei* compartments after 28 days of exposure.

Note, X-bars are standard deviation. Stars (*) represent significant difference compared to controls (Dunnett's test, $n=4$, $p> 0.05$)

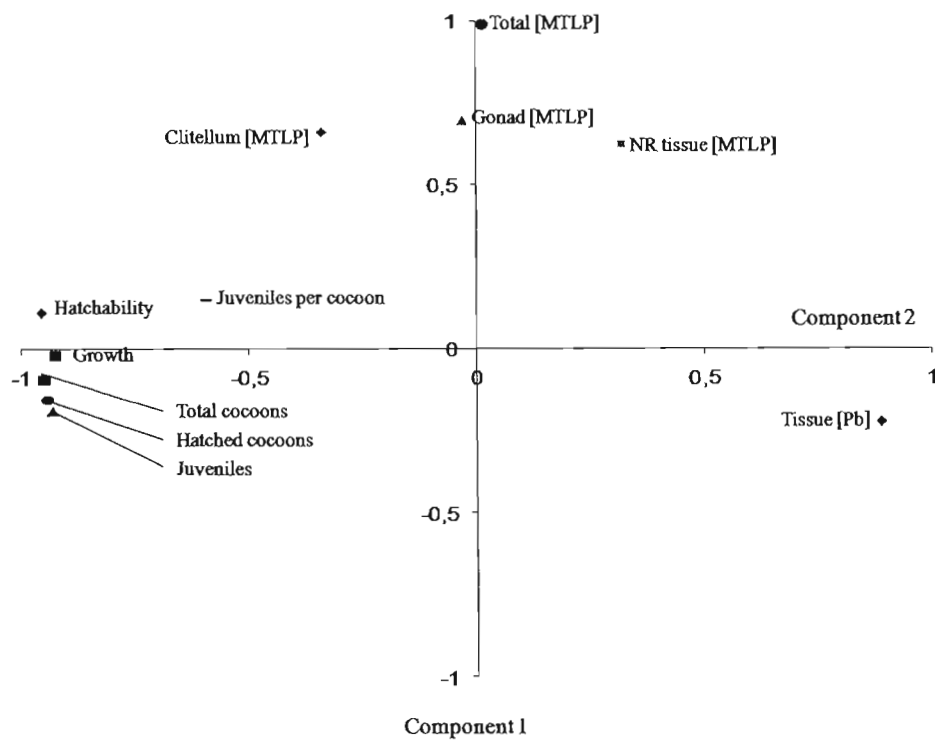


Figure 3.3 Principal Component Analysis on data obtained after Pb exposure.

Note, Varimax rotation and Kaiser normalisation were done for each variable.

Table 3.1 Effects of organic compounds on MTLP accumulation or induction, from Ndayibagira et al., unpublished.

Compound	Effect	Species
Paraquat	↑	Mice
Lindane	↓	Clam
Benzo(a)pyrene	↑	Sea bass
Monosodium methyl arsonate	↑	Catfish
Retinol	↑	Rat
Ethanol	↑	Rat
Morphine	↑	Rat
Bisphenol A	↓	Rat
Atrazine	↑	Human

↑: MT induction/ accumulation/ upregulation

↓: MT inhibition/ metabolism/ downregulation

Table 3.2. Correlations between measured variables and Pb/HMX tissue concentrations in *Eisenia andrei*.

	Correlation with					
	Pb tissue concentration			HMX tissue concentration		
	R ²	P	n*	R ²	P	n*
Reproduction parameters						
Juveniles	-0,72	<0.0001	27	-0,63	0,0004	27
Hatched cocoons	-0,76	<0.0001	27	-0,60	0,0011	27
Total cocoons	-0,81	<0.0001	27	-0,56	0,0022	27
Hatchability	-0,92	<0.0001	27	-0,59	0,0016	26
Juveniles per cocoon	-0,88	<0.0001	26	-0,62	0,0007	26
Growth	-0,87	<0.0001	27	-0,45	0,0174	27
MTLP concentrations						
Gonads	-0,08	0,7091	24	-0,79	<0.0001	25
Clitellum	-0,37	0,0775	24	-0,03	0,8825	28
Non-reproductive tissue	-0,04	0,3665	24	0,47	0,0129	27
Whole body	-0,19	0,8425	24	-0,03	0,8705	26

Note, Correlation coefficient (R^2), significance probability (P) and number of observations (n) are given for each pairs of variables. Some observations are missing due to unavailable or aberrant data. Aberrant data were removed after Mahalanobis' distance outlier analysis.

Table 3.3 Correlations between the reproduction endpoint responses and MTLP concentrations in the three body compartments and in whole worm tissue.

	Correlation with			
	gonad [MTLP]	Ciliatedum [MTLP]	NR tissue [MTLP]	Whole body [MTLP]
HMX				
	R ²	P (n=24*)	R ²	P (n=26*)
Total cocoon number	0,79	<0,0001	0,44	0,0177
Hatched cocoon number	0,92	<0,0001	0,42	0,0246
Juvenile number	0,77	<0,0001	0,47	0,0121
hatchability	0,59	0,0023	0,43	0,0212
Juvenile number per cocoon	0,49	0,0181	0,48	0,0102
Pb				
	R ²	P (n=24)	R ²	P (n=24)
Total cocoon number	0,01	0,9723	0,18	0,401
Hatched cocoon number	-0,01	0,9502	0,19	0,4096
Juvenile number	-0,07	0,7562	0,22	0,3206
hatchability	0,08	0,7356	0,43	0,0459
Juvenile number per cocoon	0,02	0,9314	0,43	0,0534
	R ²	P (n=24)	R ²	P (n=24)
Total cocoon number	0,01	0,9723	0,18	0,401
Hatched cocoon number	-0,01	0,9502	0,19	0,4096
Juvenile number	-0,07	0,7562	0,22	0,3206
hatchability	0,08	0,7356	0,43	0,0459
Juvenile number per cocoon	0,02	0,9314	0,43	0,0534

Note, Correlation coefficient (R²), significance probability (P) and number of observations (n) are given for each pairs of variables, some observations are missing due to missing or abundant data.

Table 3.4 Principal component analysis on data obtained after HMX exposure.

	Correlations with		
	Component 1	Component 2	Component 3
Tissue [HMX]	-0,78	-0,14	-0,10
Growth	0,70	0,23	0,39
Juvenile number	0,77	-0,06	0,57
Hatched cocoon number	0,84	-0,10	0,47
Total cocoon number	0,81	-0,12	0,49
Hatchability	0,35	0,04	0,74
Juvenile number per cocoon	0,27	0,09	0,79
Gonad [MTLP]	0,95	0,09	-0,02
Clitellum [MTLP]	0,03	-0,11	0,83
NR [MTLP]	-0,44	-0,82	-0,26
Whole body [MTLP]	0,16	-0,95	0,20

Note, Varimax rotation and Kaiser normalisation for each variable.

CONCLUSION GÉNÉRALE

La présente étude écotoxicologique est une évaluation des effets du Cd, du Pb et du HMX dans un sol sablonneux typique des RTA canadiens, en particulier sur l'accumulation de MTLPs dans les tissus et sur la reproduction d'une espèce bioindicatrice pertinente, soit le ver de terre *E. andrei*. Le potentiel de biomarqueur d'effet biologique précoce des métaux des MTLPs a aussi été évalué.

Cette étude confirme que le ver *E. andrei* bioaccumule le Cd et le Pb (on retrouve en effet ces contaminants dans les tissus de *E. andrei* de façon dose-dépendante suite à une exposition en sol sablonneux), et que ces derniers provoquent des effets létaux (diminution significative de la survie des vers dans les sols contaminés) et sublétaux (diminution significative de la croissance et des fonctions reproductives) chez les animaux exposés, comme il l'a été démontré lors d'études précédentes. Tel qu'observé dans des études antérieures, le HMX n'est pas léthal mais provoque des effets sous-létaux (diminution de la reproduction) sur le cycle de vie du ver *E. andrei*.

Cette étude portant sur le Cd, le Pb et le HMX a aussi permis de témoigner de l'importance des divers paramètres du sol sur la toxicité des contaminants. En effet, ces substances toxiques ont eu des effets néfastes dans le sol sablonneux des RTA pour des concentrations qui sont sans effet observable dans les sols artificiels ou de type forestier. Au regard de nos résultats et des études précédentes, les caractéristiques des sols semblent donc importantes lors des essais de toxicité qui utilisent le ver *E. andrei*, car ces dernières modifient fortement la réponse du ver à la

toxicité du Cd, du Pb et du HMX. La biodisponibilité des produits toxiques semble expliquer ce phénomène.

L'exposition des vers *E.andrei* à un sol contaminé par le Cd augmente de façon significative et de façon dose-dépendante les concentrations tissulaires de MTLPs, comme démontré en sol artificiel et/ou naturel dans les études précédentes. Toutefois, après exposition au Pb ou au HMX et lorsque l'on considère les valeurs de MTLPs dans les vers entiers, nous n'observons aucune différence significative entre les traitements (aucune induction ou inhibition). Ceci laisse suggérer que ces substances n'induisent pas des quantités significatives de MTLPs. Pourtant, la segmentation mécanique du ver de terre en trois portions différentes nous a permis d'observer des modulations sous-jacentes inconnues à ce jour et qui étaient indécélables au niveau du corps entier après exposition au HMX. Effectivement, après segmentation, alors que le Pb n'induit aucune MTLPs, ni dans les tissus qui ne sont pas relié a la reproduction, ni dans les tissus dit "reproductifs", le HMX diminue de façon significative les quantités de MTLPs dans la portion "gonades" et augmente de la même façon les MTLPs dans les tissus qui ne sont pas relié a la reproduction. Pour expliquer un tel phénomène, nous envisagerons l'hypothèse selon laquelle l'induction des MTLPs dans ce type de tissus constituerait une réponse du ver à un stress (oxydatif?) causé par le HMX et/ou par ses métabolites et dérivés. Parallèlement, il serait possible que le HMX provoque de façon directe ou indirecte la mort des cellules des gonades, ce qui expliquerait les effets du HMX sur les concentrations de MTLPs dans ces tissus et sur la reproduction du ver *E. andrei*. Ces observations tendent à confirmer la présence d'un mécanisme de détoxification différent pour le HMX et autres que la liaison aux MTLPs (e.g. la liaison aux protéines de haut poids moléculaire ou aux autres protéines de détoxification de type GSH).

En plus d'être de bons biomarqueurs d'exposition au Cd, les MTLPs offrent un réel potentiel de biomarqueur d'effet biologique précoce du Cd chez le ver *E. andrei* et montrent des perspectives intéressantes (e.g. biosurveillance de sites

contaminés comme des mines, application à d'autres organismes, terrestres et aquatiques). Nos résultats suggèrent que les mesures de MTLPs dans les vers de terre peuvent fournir de nombreuses informations utiles sur la biodisponibilité du Cd dans les sols. Cependant, les concentrations tissulaires des MTLPs ne semblent être d'aucune utilité après exposition au Pb, sauf peut être dans les cas d'expositions mixtes (e.g. Pb et autre métaux, Pb et HMX). Dans le cas actuel de contaminations multiples des RTA, e.g. métaux et substances énergétiques, d'autres expériences doivent être entreprises car il est possible que les concentrations de MTLPs soient modulées de façon différente lors d'expositions à plus d'un contaminant. Cette étude ouvre la voie à des recherches plus approfondies avec des contaminants comme le Pb et le HMX, des substances dont les effets sur MTLPs ont peu (Pb) ou pas (HMX) été reportés dans la littérature. Si aucun effet significatif et intéressant n'a été observé après exposition au Pb, les MTLPs montrent certains éléments remarquables suite à une exposition au HMX (en particulier au niveau des gonades). Il serait intéressant de réaliser ces mêmes travaux sur d'autres composés (e.g. autres substances énergétiques et pesticides) qui affectent indirectement la MT et qui sont impliqués plus directement dans les mécanismes d'effet (stress oxydant, reproduction). Les différentes réponses des MTLPs observées lors de cette étude nous suggèrent une classification des métaux en au moins deux groupes : 1) ceux comme le Cd qui sont liés par les MTLPs dans les structures de type cadmosome et qui induisent ces protéines de façon directe (via le mécanisme d'induction connu) et 2) ceux comme le Pb qui s'accumulent sous forme non toxique dans les chloragosomes et qui n'induisent pas les MTLPs. Il est toutefois difficile de proposer définitivement une telle classification en se basant sur seulement deux exemples (Cd et Pb). Il faudrait alors réaliser ces mêmes études avec d'autres métaux toxiques (e.g. Chrome, cuivre,...) et poursuivre avec le Cd et le Pb (e.g. induction vs. fixation aux MTLPs, différentes voies et mécanismes d'induction). Les MTLPs peuvent être induites de façon directe, par les substances qui se fixent sur la protéine et libèreraient les métaux de la MT qui à leurs tours induiraient les MTs (comme c'est le cas avec l'anion superoxide qui se fixe sur la MT et libère un ion métallique);

ou de façon indirecte (les substances ne se fixeraient pas sur la MT mais les induirait via la production de ROs ou de dérivés alkylant).

Aussi, notre étude a démontré clairement que l'ACP et les analyses multivariées sont des outils statistiques pertinents lors d'approches combinées de biomarqueurs et de paramètres de reproduction. L'ACP nous a en effet permis d'observer de nombreuses relations existant entre les variables, dans une approche intégrant plusieurs biomarqueurs et de nombreux paramètres standards de toxicité. Ces analyses présentent, en effet, de façon lisible et facile d'interprétation, les relations entre les variables dans une simple représentation graphique en deux ou trois dimensions. L'utilisation conjointe de plusieurs biomarqueurs ou "approche multimarqueurs" (e.g. enzymes antioxydantes, enzymes de détoxification, fragilité de la membrane lysosomiale, phagocytose, MTLPs et biomarqueurs de la reproduction comme les mesures de vitellogénine ou de synthèse d'ADN foetal) couplés aux paramètres standards de toxicité permettraient une meilleure vue d'ensemble des effets d'une exposition et favoriserait la compréhension de la toxicité observée.

La méthode HPLC en phase inverse avec un mode d'élution isocratique consiste en une méthode rapide et sensible afin de mesurer quantitativement et directement des concentrations de MTLPs dans les vers entiers ou dans des portions de l'animal. Cette méthode peut également être appliquée avec facilité à des tissus d'autres espèces animales pertinentes: elle a été validé pour plusieurs autres organismes tel que certains invertébrés benthiques (e.g., moules, chironomes, amphipodes). Cette méthode peut aussi être optimisée afin de discriminer les différentes isoformes des MTLPs à partir d'homogénats de tissus. Il serait aussi possible et pertinent de récolter puis de séquencer la fraction éluee correspondant au pic de MTLPs et de procéder à des analyses par spectrométrie de masse. Il sera aussi intéressant de savoir si les propriétés des protéines liant les métaux dans notre étude (poids moléculaire, comportement chromatographique, absorbance U.V., stabilité après traitement à la chaleur et à l'acide, comportement

polarographique et abondance des groupements thiols) permettent leur désignation définitive en tant que MT.

Lors de notre étude, nous avons choisi de ne pas discriminer les MTLPs des différentes portions de celles des chloragocytes présent en grandes quantités dans le tube digestif, en particulier dans le canal alimentaire antérieur, qui court dans les segments portant les gonades et le clitellum. Il y aurait alors possiblement eue des interférences entre les quantités respectives de MTLPs et nos résultats en seraient biaisés. Il serait alors possible de procéder à l'ablation du système digestif du ver, afin de "retirer" les chloragocytes et d'autres cellules impliquées dans le transport et/ou l'accumulation des produits toxiques présents dans le canal digestif antérieur. On pourrait en effet utiliser ce tractus en tant que portion à part entière dans nos prochaines études de segmentation. Des travaux en cours à l'IRB vont en ce sens : en séparant le tractus digestif de *E. andrei* tractus du reste du corps, on pourra en savoir plus sur la localisation et le devenir des polluants dans le ver. De plus, *Lumbricus terrestris*, aussi appelé ver de terre commun possède l'avantage d'être beaucoup plus gros qu' *E. andrei*. Ses gonades, ainsi que le tube digestif et d'autres organes sont plus accessibles en vue d'une dissection. L'utilisation de cette espèce permettrait de réduire l'interférence avec d'autres tissus et la segmentation donnerait plus de tissus pour les analyses. Les résultats sur les concentrations de MTLPs dans les tissus seraient plus précis.

BIBLIOGRAPHIE

- Ait-Oukhatar, N., F. Bureau, M. Boudey, C. Place, P. Jauzac, M. A. Drosdowsky, P. Arhan et D. Bougle. 1996. "Determination of MT by HPLC: application to zinc metabolism". *Ann.Biol.Clin.*, vol.54, p. 87-90.
- Amiard J.-C. et C. Amiard-Triquet. 2008. *Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques*. Paris (France): Editions Tec & Doc, Lavoisier. 370p.
- Ampleman, G., S. Thiboutot, A. Gagnon, A. Marois., R. Martel et R. Lefebvre. 1998 "Study of the Impacts of OB/OD Activity on Soils and Groundwater at the Destruction Area in CFAD Dundurn". Rapport DREV-R-9827. Defense R&D Canada, Valcartier, Québec. 71 p.
- Ampleman, G., S. Thiboutot, S. Desilets, A. Gagnon. Et A. Marois. 2000. "Evaluation of the soil contamination by explosives at CFB Chilliwack and CFAD Rocky point". Rapport DREV-TR-2000-103. Defense R&D Canada, Valcartier, Québec)
- Ampleman, G., S. Thiboutot, J. Lewis, A. Marois, A. Gagnon, M. Bouchard, R. Martel, R. Lefebvre, C. Gauthier, J.M. Ballard, T. Jenkins, T. Ranney, et J. Pennington. 2003 "Evaluation of the Impacts of Live Fire Training at CFB Shilo (Final report)". Rapport DRDC-Valcartier TR 2003-066. Defense R&D Canada, Valcartier, Québec.
- Ampleman, G., S. Thiboutot, J. Lewis, A. Marois, A. Gagnon et M. Bouchard. 2004. "Evaluation of the contamination by explosives and metals in soils, vegetation, surface water and sediment at Cold Lake Air Weapons Range (CLAWR), Alberta, Phase II, Final Report". Rapport DRDC-VALCARTIER-TR-2004-204. Defense R&D Canada, Valcartier, QC, CA and Cold Region Research and Engineering Lab, Hanover, NH, USA.
- Andrews, G. K. 2000. "Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions". *Biochem Pharmacol.*, vol. 59, no 1, p. 95-104.

- Arnaud, C., M. Saint Denis, J. F. Narbonne, P. Soler et D. Ribeira. 2000. "Influences of different standardised test methods on biochemical responses in earthworm *Eisenia fetida andrei*". *Soil Biology & Biochemistry*, vol. 32, p. 67-73.
- Astley, K. N., H. C. Meigh, G. A. Glegg, J. Braven et M. H. Depledge. 1999. "Multivariate analysis of biomarker responses in *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas* from the Tees estuary (UK)". *Mar.Poll.Bull.*, vol. 39, no. 1-12, p. 145-154.
- Auroy, A. 2004. "Utilisation de biomarqueurs dans l'évaluation de la toxicité de composés nitrés et de métaux lourds chez le ver de terre *Eisenia andrei*". Mémoire présenté comme exigence à la maîtrise en sciences de l'environnement – Université du Québec à Montreal. En préparation.
- Bacolod, M. D., R. Fehdrau, S. P. Johnson, N. S. Bullock, D. D. Bigner, M. Colvin et H. S. Friedman. 2009. "BCNU-sequestration by metallothioneins may contribute to resistance in a medulloblastoma cell line". *Cancer Chemother Pharmacol.* Vol. 63, p. 753–758.
- Barjaktarovic, L., J. E. Elliott et A. M. Scheuhammer. 2002. "Metal and metallothionein concentrations in scoter (*Melanitta* spp.) from the Pacific Northwest of Canada, 1989-1994". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 43, no 4, p. 486-491.
- Beliaeff, B. et T. Burgeot. 2002. "Integrated Biomarker Response: A Useful tool for ecological risk assessment". *Environ. Tox. Chem.*, vol. 21, no. 6, p. 1316–1322.
- Bell, J. U., et J. M. Lopez. 1985. "Isolation and partial characterization of a cadmium-binding protein from the liver of alligators exposed to cadmium". *Comp. Biochem. Physiol. C.*, vol. 82, no. 1, p. 123-128.
- Bengtsson, G., S. Nordstrom et S. Rundgren. 1983. "Population density and tissue metal concentration of Lumbricids in forest soils near a brass mill". *Environ.Poll.*, vol. 30, p. 87-108.
- Bengtsson, G., H. Ek et S. Rudgren. 1992. "Evolutionary response of earthworms to long term metal exposure". *Oikos*, vol. 63, p. 289-297.
- Bentley, R. E., G. A. Leblanc, T. A. Hollister et B. H. Sleight. 1977. "Acute toxicity of octahydro-1,3,5,7-tetranitro-octahydro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX) to aquatic organisms. Final Report". AD A061 730. EG & G Bionomics, Wareham, MA, USA.

- Bentley, R. E., S. R. Petrocelli et D. C. Suprenant. 1984. "Determination of the toxicity to aquatic organisms of HMX and related wastewater constituents. Part III. Toxicity of HMX, TAX and SEX to aquatic organisms. Final Report. ". Rapport AD A172 384. Springborn Bionomics, Wareham, MA, USA.
- Berger, B., R. Dallinger et A. Thomaser. 1995a. "Quantification of metallothionein as a biomarker for cadmium exposure in terrestrial gastropods". *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol.14, p. 781-791.
- Berger, B., P. E. Hunziker, C. R. Hauer, N. Birchler et R. Dallinger. 1995b. "Mass spectrometry and amino acid sequencing of two cadmium-binding metallothionein isoforms from the terrestrial gastropod *Arianta arbustorum*". *Biochem. J.*, vol. 311, no.3, p. 951-957.
- Berglund, R., G. Dave et M.-L. Sjöbeck. 1985. "The effects of lead on δ -aminolevulinic acid dehydratase activity, growth, hemoglobin content and reproduction in *Daphnia magna*". *Ecotox. Environ. Safe.*, vol. 9, p. 216-229.
- Berthelot, Y., B. Trottier, P.-Y. Robidoux. 2008a. "Assessment of soil quality using bioaccessibility-based models and a biomarker index". *Environ. Int.*, vol. 35, no. 1, p. 83-90.
- Berthelot, Y. 2008b "Évaluation de la biodisponibilité des métaux et des matériaux énergétiques dans les sols provenant de sites d'entraînement militaire". Thèse présentée comme exigence partielle au doctorat en sciences de l'environnement – Université du Québec à Montreal.
- Berthelot, Y., E. Valton, A. Auroy, B. Trottier et P.-Y. Robidoux. 2008c. "Integration of toxicological and chemical tools to assess the bioavailability of metals and energetic compounds in contaminated soils". *Chemosphere*, vol. 74, no. 1, p. 166-177.
- Bérubé, V., A. Ndayibagira, A. Michaud, G. Triffault-Bouché, H. Fanou, I. Young, G. I. Sunahara et P.-Y. Robidoux. 2006. "Metallothionein-like proteins (MTLPs) quantification in freshwater invertebrates by a rapid and sensitive isocratic HPLC-UV method". SETAC North America 27th Annual Meeting, Montreal, Quebec, Canada, Novembre 2006.
- Bérubé, V., M.-C. Tardiff, G. Triffault-Bouché, C. Bastien, G. I. Sunahara et P.-Y. Robidoux. 2007. "Metallothionein-like proteins (MTLPs) quantification in invertebrates by a rapid and sensitive isocratic HPLC-UV method". SETAC Europe 17th Annual Meeting, Porto, Portugal, Mai 2007.
- Blaise, C., F. Gagné, J. Pellerin, P.-D. Hansen et S. Trottier 2002. "Molluscan shellfish biomarker study of the Quebec, Canada, Saguenay Fjord with the soft-shell clam *Mya arenaria*". *Environ. Toxicol.*, vol. 17, no. 3, p. 170-186.

- Bodar, C. W. M., I. van der Sluis, P. A. Voogt et D. I. Zander. 1988. "Effects of cadmium on consumption, assimilation and biochemical parameters of *Daphnia magna*: possible implications for reproduction". *Comp.Biochem.Physiol.C*, vol. 90, no. 2, p. 341-346.
- Booth, L. H., V. J. Heppelthwaite et K. O'Halloran. 2000. "Growth, Development and Fecundity of the earthworms *Aporrectodea caliginosa* after Exposure to two Organophosphates". *New Zealand Plant Protection*, vol. 53, p. 221-225.
- Bradford, M. M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical Biochemistry*, vol. 72, p. 248-254.
- Brdicka, R. 1933. "Polarographic studies with the dropping mercury electrode". *Collection Czech. Chem. Commun.*, vol. 5, p. 112-128.
- Bremner, I. et J. H. Beatie. 1990. "Metallothionein and the trace minerals". *Annu.Rev.Nutr.*, vol. 10, p. 63-83.
- Brown, M. W., D. Shurben, J. F. De L. G. Solbe, A. Cryer et J. Kay. 1987. "Sequestration of environmental cadmium by metallothionein in the roach (*Rutilus rutilus*) and the stone loach (*Noemacheilus barbatulus*)". *Comp.Biochem.Physiol.C.*, vol. 87, p. 65-69.
- Burger, J., C. G. Lord, E. J. Yurkow et L. McGrath. 2000. "Metals and metallothionein in the liver of raccoons: utility for environmental assessment and monitoring". *Journal of Toxicology and Environmental Health*, vol. 60A, p. 243-261.
- Calabrese, E. 2004. "Hormesis: a revolution in toxicology, risk assessment and medicine". *EMBO*, vol. 5, p. S37-S40.
- Campbell, P. G. C., A. Tessier, Y. Couillard. et S. Micallef. 1990. "Biochemical indicators of environmental stress caused by heavy metals". Progress report N°1, Wildlife Toxicological Fund, Environment Canada, Ottawa, Ontario. Rapport Scientifique N°294, INRS-Eau, Ste-Foy, Quebec.
- Card Jr, R.E. et R. Autenrieth. 1998. "Treatment of HMX and RDX contamination". Rapport ANRCP-1998-2. Amarillo National Resource Center for Plutonium, Amarillo, TX, USA. 48 p.
- CCME - Canadian Council of Ministers of the Environment. 2006. "Canadian soil quality guidelines for the protection of environmental and human health: Summary tables". Updated in November 2006. In: *Canadian Environmental Quality Guidelines*, 1999, Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg.

- CEAEQ - Centre d'Expertise en Analyse Environnemental du Québec. 2003a. "Détermination des métaux dans les tissus animaux : méthode par spectrométrie d'émission au plasma d'argon après minéralisation acide. MA 207-Met1.0". Québec, QC, Canada.
- CEAEQ - Centre d'Expertise en Analyse Environnemental du Québec. 2003b. "Détermination des métaux : méthode par spectrométrie de masse à source ionisante au plasma d'argon. MA 200-met1.1". Québec, QC, Canada.
- CEPA - Canadian Environmental Protection Act. 1994. "Priority Substances List. Assessment report. Cadmium and its compounds." Government of Canada - Environment Canada and Health Canada.
- Chabicoovsky, M., H. Niederstätter, R. Thaler, E. Hödl, W. Parson, W. Rossmanith et R. Dallinger. 2003. "Localization and quantification of Cd- and Cu-specific metallothionein isoform mRNA in cells and organs of the terrestrial gastropod *Helix pomatia*". *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 190, p. 25-36.
- Chapman, K. K., M. J. Benton, R. O. Brinkhurst et P. R. Scheuerman. 1999. "Use of the aquatic oligochaetes *Lumbricus variegatus* and *Tubifex tubifex* for assessing the toxicity of copper and cadmium in a spiked-artificial-sediment toxicity test". *Environ. Toxicol.*, vol. 14, p. 271-278.
- Cherian, M. G. et R. A. Goyer. 1978. "Metallothionein and their role in the metabolism and toxicity of metals". *Life.Sci.*, vol. 23, p. 1-10.
- Cooke, A. S., P. W. Greig-Smith et S. A. Jones. 1992. "Consequences for vertebrate wildlife of toxic residues in earthworm prey". In *Ecotoxicology of earthworm*, P. W. Greig-Smith, H. Becker, P. J. Edwards and F. Heimbach (eds). Amdover (UK): Intercept. P. 109-115.
- Correia, A. D., A. Sousa, M. H. Costa, I. Moura et D. R. Livingstone. 2004. "Quantification of Metallothionein in whole body *Gammarus locusta* (crustacea: amphipoda) using differential pulse polarography". *Toxicol.Environ.Chem.*, vol. 86, no. 1, p. 23-26.
- Couillard, Y., P. G. C. Campbell et A. Tessier. 1993. "Response of metallothionein concentrations in a freshwater bivalve (*Anodonta grandis*) along an environmental cadmium gradient". *Limnol.Ocean.*, vol. 38, no. 2, p. 299-313.
- Coyle, P., J. C. Philcox, L. C. Carey et A. M. Rofe. 2002. "Metallothionein: the multipurpose protein". *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 59, p. 627-647.

- Crocker, F. H., K. J. Indest et I.-I. L. Fredrickson. 2006. "Biodegradation of the cyclic nitramine explosives RDX, HMX, and CL-20". *Appl. Microbiol. Biot.*, vol. 73, p. 274-290.
- Dallinger, R. 1994. "Invertebrate organisms as biological indicators of heavy metals pollution". *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 14, no. 2, p. 27-31.
- Dallinger, R. 1996. "Metallothionein research in terrestrial invertebrates: Synopsis and perspectives". *Comp. Biochem. Physiol. C.*, vol. 113, no. 2, p. 125-133.
- Dallinger, R., B. Berger, P. Hunziker et J. H. R. Kägi. 1997. "Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism". *Nature*, vol. 388, p. 237-238.
- Dallinger, R., M. Chabicoovsky et B. Berger. 2004a. "Isoform-specific quantification of metallothionein in the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. I. molecular, biochemical, and methodological background". *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 23, no. 4, p. 890-901.
- Dallinger, R., M. Chabicoovsky, B. Lagg, R. Schipflinger, H. G. Weirich et B. Berger. 2004b. "Isoform-specific quantification of metallothionein in the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. II. A differential biomarker approach under laboratory and field conditions". *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 23, no. 4, p. 902-910.
- Dallinger, R., B. Lagg, M. Egg, R. Schipflinger et M. Chabicoovsky. 2004c. "Cd accumulation and Cd-metallothionein as a biomarker in *Cepea hortensis* (Helicidae, Pulmonata) from laboratory exposure and metal-polluted habitats". *Ecotoxicology*, vol. 13, p. 757-772.
- Davies, N., M. Hodson et S. Black. 2003a. "The influence of time on lead toxicity and bioaccumulation determined by the OECD earthworm toxicity test". *Environmental Pollution*, vol. 121, p. 55-61.
- Davies N., M. Hodson et S. Black. 2003b. "Is the OECD acute worm toxicity test environmentally relevant? The effect of mineral form on calculated lead toxicity". *Environmental Pollution*, vol. 121, p. 49-54.
- Demuynck, S., F. Grumiaux, V. Mottier, D. Schilkorski, S. Lemièrre et A. Leprêtre. 2006. "Metallothionein response following cadmium exposure in the oligochaete *Eisenia fetida*". *Comp. Biochem. Physiol. C.*, vol. 144, p. 34-36.
- Dhainaut A. et P. Scaps. 2001. "Immune defense system and biological responses induced by toxics in Annelida". *Canadian Journal of Zoology*, vol. 79, p. 242-243.

- Dodard, S. G., G. I. Sunahara, R. G. Kuperman, M. Sarrazin, P. Gong, G. Ampleman, S. Thiboutot et J. Hawari. 2005. "Survival and reproduction of enchytraeid worms, oligochaeta, in different soil types amended with energetic cyclic nitramines". *Environ.Toxicol.Chem.*, vol. 24, no. 10, p. 2579-2587.
- Dragun, Z., M. Erk, B. Raspor, D. Ivanković et J. Pavičić. 2004. "Metal and metallothionein level in the heat-treated cytosol of gills of transplanted mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk". *Environment International*, vol 30, p. 1019– 1025.
- Edwards, C. A. et P. J. Bohlen. 1992. "The effects of toxic chemicals on earthworms". *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 125, p. 23-100.
- Edwards, C. A. et P. J., Bohlen. 1996. *Biology and ecology of earthworms. Third Edition*. London (UK): Chapman and Hall. 426 p.
- Efroymson, R. A., M. E. Will, G. W. Suter II. 1997. "Toxicological benchmarks for contaminants of potential concern for effects on soil and litter invertebrates and heterotrophic process". Rapport Es/Er/Tm-126/R2. Oakridge National Laboratory, Oakridge, Tennessee, USA.
- El Ghazi, I., S. Menge, J. Miersch, A. Chafik, A. Benhra, M. K. Elamrani et G. J. Krauss. 2003. "Quantification of MT like proteines in the mussels *Mytilus galloprovincialis*". *Environ.Sci.Technol.*, vol. 37, p. 5730-5744.
- Elliott, J. E., A. M. Scheuhammer, F. A. Leighton, et P. A. Pearcet. 1992. "Heavy Metal and Metallothionein Concentrations in Atlantic Canadian Seabirds". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 22, p. 63-73.
- Fitzpatrick, L. C., J. F. Muratti-Ortiz, B. J. Venables et A. J. Goven. 1996. "Comparative toxicity in earthworms *Eisenia andrei* and *Lumbricus terrestris* exposed to cadmium nitrate using artificial soil and filter paper protocols". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 57, p.63-68.
- Frenzilli, G., R. Bocchetti, M. Pagliarecci, M. Nigro, F. Annarumma, V. Scarcelli, D. Fattorini et F. Regoli. 2004. "Time-course evaluation of ROS-mediated toxicity in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment". *Mar. Environ. Res.*, vol. 58, p. 609-613.
- Furst, A. et G. Nguyen. 1989. "Cadmium-induced metallothionein in the earthworm *Lumbricus rubellus*". *Biol.Trace.Elem.Res.* vol. 21, p. 81-85.
- Furst, A. 2002. "My saga with earthworms". *Food and chemical toxicology*, vol. 40, p. 789-791.

- Gagné, F., C. Blaise, I. Aoyama, R. Luo, C. Gagnon, Y. Couillard, P. Campbell et M. Salazar. 2002. "Biomarker study of a municipal effluent dispersion plume in two species of freshwater mussels". *Environ. Toxicol.*, vol. 17, p. 149-159.
- Gagné, F., C. Blaise et J. Pellerin. 2005a. "Altered exoskeleton composition and vitellogenesis in the crustacean *Gammarus* sp. collected at polluted sites in the Saguenay Fjord, Quebec, Canada". *Environmental Research*, vol. 98, p. 89-99.
- Gagné, F. et C. Blaise. 2005b. "Review of biomarkers and new techniques for in situ aquatic studies with bivalves". In: *Environmental toxicity testing*. K.C. Thompson, K. Wadhia and A.P. Loibner (eds). Oxford (UK): Blackwell publishing, and Boca Raton (USA): CRC Press. pp 206-228.
- Galay-Burgos, M., D. J. Spurgeon, J. M. Weeks, S. R. Stürzenbaum, A. J. Morgan et P. Kille. 2003. "Developing a new method for soil pollution monitoring using a molecular genetic biomarker". *Biomarkers*, vol 8, no. 3-4, p. 229-239.
- Galay-Burgos, M., C. Winters, S. R. Stürzenbaum, P. F. Randerson, P. Kille et A. J. Morgan. 2005. "Cu and Cd effects on the earthworm *Lumbricus rubellus* in the laboratory: Multivariate statistical analysis of relationship between exposure, biomarkers and ecologically relevant parameters". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, p. 1757-1763.
- Galloway, T. S., R. J. Brown, M. A. Browne, A. Dissanayake, D. Lowe, M. B. Jones et M. H. Depledge. 2004. "A multibiomarker approach to environmental assessment". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 38, p. 1723-1731.
- Garrett, S. H., S. Somji, J. H. Todd, M. A. Sens et D. A. Sens. 1998. "Differential expression of human metallothionein isoform I mRNA in human proximal tubule cells exposed to metals". *Environ. Health. Perspect.*, vol. 106, p. 825-832.
- Ghedira, J., J. Jebali, Z. Bouraoui, M. Banni, H. Guerbej, et H. Boussetta. 2009. "Metallothionein and metal levels in liver, gills and kidney of *Sparus aurata* exposed to sublethal doses of cadmium and copper". *Fish Physiology and Biochemistry*, publié en ligne le 11 December 2008: <http://www.springerlink.com/content/x81531558173x15g/>
- Gillis, P. L., L. C. Diener, T. B. Reynoldson et D. G. Dixon. 2002. "Cadmium-induced production of metallothionein-like protein in *Tubifex tubifex* (Oligochaeta) and *Chironomus riparius* (Diptera): correlation with reproduction and growth". *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 21, p. 1836-1844.

- Gillis, P. L., T. B. Reynoldson et D. G. Dixon. 2004. "Natural variation in metallothionein-like protein in *Tubifex tubifex* in the absence of metals". *Ecotox. Environ. Safe.*, vol. 58, p. 22-28.
- Greenwood, N. N. et A. Earnshaw. 1984. *Chemistry of the Elements*. Oxford (UK): Butterworth-Heinemann. 1600p.
- Gruber, C., S. R. Stürzenbaum, P. Gehrig, R. Sack, P. Hunziker, B. Berger et R. Dallinger. 2000. "Isolation and characterization of a self-sufficient one-domain protein (Cd)-metallothionein from *Eisenia foetida*". *Eur. J. Biochem.*, vol. 267, p. 573-582.
- Guo, X., H. M. Chan, R. Guevremont et K. W. M. Siu. 1999. "Analysis of metallothioneins by means of capillary electrophoresis coupled to electrospray mass spectrometry with sheathless interfacing". *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.*, vol. 13, p. 500-507.
- Hickman, C. P. J., L. S. Roberts et A. Larson (eds.) 1996. *Integrated principles of zoology*. Boston (USA): WCB McGraw-Hill. 960p.
- Hogstrand, C., G. Lithner et C. Haux 1991. "The importance of metallothionein for the accumulation of copper, zinc and cadmium in environmentally exposed perch, *Perca fluviatilis*". *Pharmacology & Toxicology*, vol. 68, no. 6, p. 492-501.
- Homa, J., E. Olchawa, S. R. Stürzenbaum, A. J. Morgan et B. Plytycz. 2005. "Early-phase immunodetection of metallothionein and heat shock proteins in extruded earthworm coelomocytes after dermal exposure to metal ions". *Environmental Pollution*, vol. 135, p. 275-280.
- Honsi, T. G., L. Hoel et J. V. Stenersen. 1999. "Non-inducibility of antioxidant enzymes in the earthworms *Eisenia veneta* and *E. fetida* after exposure to heavy metals and paraquat". *Pedobiologia*, vol. 43, p. 652-657.
- Hopkin, S. P. 1989. *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates*. London (UK): Elsevier applied science. 366p.
- Huang, P. C. et C.W. Cody. 1993. "Metallothionein detoxification function is impaired by replacement of both conserved lysines with glutamines in the hinge between the two domains". *Biochemistry*, vol. 32, no. 19, p. 5127-5131.
- Hughes, S. et S. R. Sturzenbäum. 2007. "Single and double metallothionein knockout in the nematode *C. elegans* reveals cadmium dependant and independant toxic effects on life history traits". *Environmental pollution*, vol. 145, no. 2, p. 395-400.

- Hunziker, P. E. et J. H. R. Kägi. 1985. "Isolation and characterization of six human hepatic isometallothioneins". *Biochem.J.*, vol. 231, p. 375-382.
- Hyllner, S. J., T. Andersson, C. Haux, et P.-E. Olsson. 1989. "Cortisol induction of metallothionein in primary culture of rainbow trout hepatocytes". *Journal of Cellular Physiology*, vol. 139, no. 1, p. 24-28.
- Ikebuchi, H., R. Teshima, K. Suzuki, T. Terao et Y. Yamane. 1986. "Simultaneous induction of Pb-metallothionein-like protein and Zn-thionein in the liver of rats given lead acetate". *Biochem. J.*, vol. 233, p. 541-546.
- Ireland, M. P. 1975. "Distribution of lead, Zinc and calcium in *Dendrobaena rubida* (oligochaete) living in soil contaminated by base metal mining in Wales". *Comp.Biochem.Physiol.B.*, vol. 52, p. 551-555.
- Ireland, M. P. 1978. "Heavy metal binding proprieties of earthworm chloragosomes". *Acta. Biol. Acad. Sci. Hung.*, vol. 29, no. 4, p. 385-395.
- Ireland, M. P. 1983. "Heavy metal uptake and tissue distribution in earthworm". In: *Earthworm ecology from Darwin to vermiculture*. J. E. Satchell (eds). London (UK): Chapman and Hall. p. 247-265.
- ISO. 1993. "Soil quality -- Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate". ISO 11268-1. International Organisation for Standardization, Geneva, Switzerland
- ISO. 1998. "Soil quality -- Effect of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction". ISO 11268-2. International Organisation for Standardization, Geneva, Switzerland
- Jamieson, B. 1981. *The ultrastructure of the oligochaeta*. London (UK): Academic Press. 462p.
- Jordan, S. A., M. K. Bhatnagar et W. J. Bettger. 1990. "Combined effects of methylmercury, lead, and cadmium on hepatic metallothionein and metal Concentrations in the Pekin duck". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 19, p. 886-891.
- Kägi, J. H. R. 1991. "Overview of metallothionein". *Methods. Enzymol.*, vol. 205, p. 613-626.
- Kaiser, J. 2003. "Hormesis: Sipping From a Poisoned Chalice." *Science*, vol. 302, no. 5644, p. 376-379.

- Kammenga, J. E. , R. Dallinger, M. H. Donker, H.-R. Köhler, V. Simonsen, R. Triebkorn et J. M. Weeks. 2000. "Biomarkers in terrestrial invertebrates for ecotoxicological soil risk assessment". *Rev.Environ.Contam.Toxicol.*, vol. 164, p. 93-147.
- Klaassen, C. D. 1995. *Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons. 5th edition*. New York: McGraw-Hill. 912p.
- Klaassen, C. D., J. Liu et S. Choudhuri. 1999. "Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity". *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, vol. 39, p. 267-294.
- Klaverkamp, J. F., K. Wautier et C. L. Baron. 2000. "A modified mercury saturation assay for measuring metallothionein". *Aquatic Toxicology*, vol. 50, p. 13-25.
- Kruse-Jarres, J. D. 1989. "Significance of Zinc humoral and cellular immunity". *J. Trace. Elem. Electrolytes. Health. Dis.*, vol. 3, p. 1-8.
- Kuperman, R. G., R. T. Checkai, M. Simini, C. T. Phillips, J. E. Kolakowski, C. W. Kurnas et G. I. Sunahara. 2004. "Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeida) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX". *Pedobiologia*, vol. 47, p. 651-656.
- Kuperman, R. G., R. T. Checkai, M. Simini, C. T. Phillips, J. E. Kolakowski et N. A. Chester. 2007. "Ecological soil screening levels for invertebrates at explosives-contaminated sites: Supporting sustainability of Army testing and training". U.S. Army Edgewood Chemical Biological Center, Aberdeen Proving Ground, Maryland, USA.
- Kwang, W. A., H. S. Shin et C.Y. Choi. 2008. "Physiological responses and expression of metallothionein (MT) and superoxide dismutase (SOD) mRNAs in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to benzo[a]pyrene". *Comp. Biochem. Physiol. B.*, vol. 149, no. 3, p. 534-9.
- Lachance, B., P.-M. Bergeron, V. Bérubé, G.I. Sunahara et P.Y. Robidoux. 2008. "Validation of environmental military threshold values for explosives in soil". Final report NRC#49926. National Defence, Ottawa, ON, et CNRC-IRB Montreal, QC, Canada.
- Lagadic, L., T. Caquet, J.-C. Amiard et F. Ramade. 1997. *Biomarqueurs en Ecotoxicologie : Aspects Fondamentaux*. Paris : Masson. 432p

- Lagadic, L., J.-C. Amiard, T. Caquet et F. Ramade. 1998. "Biomarqueurs et évaluation de l'impact écologique des polluants". In: *Utilisation des biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*. L. Lagadic, T. Caquet, J. C. Amiard and F. Ramade (eds). Paris : Lavoisier. pp 77-78 et 299-307.
- Lanno, R., J. Wells, J. Conder, K. Bradham et N. Basta. 2004. "The bioavailability of chemicals in soil for earthworms". *Ecotoxicology and environmental safety*, vol. 57, no. 1, p. 39-47.
- Laszczyca, P., M. Augustyniak, A. Babczynska, K. Bednarska, A. Kafel, P. L. Migula, G. Wilczek, et L. Witas. 2004. "Profiles of enzymatic activity in earthworms from zinc, lead and cadmium polluted areas near Olkusz (Poland)". *Environ. Int.*, vol. 30, p. 901-910.
- LCPE. Loi Canadienne de Protection de l'Environnement. 1999. Liste des substances toxiques. Mise à jour le 13 août 2003.
- Lebart, L., A. Morineau et M. Piron. 2001. *Statistique exploratoire multidimensionnelle*. 3^e édition. Paris: Dunod. 439p.
- Lehman, L. D. et C. D. Klaassen. 1986. "Separation and quantitation of metallothionein by high performance liquid chromatography coupled with atomic absorption spectrometry". *Anal.Biochem.*, vol. 153, p. 305-314.
- Lenntech. 2004. "Traitement de l'air et de l'eau". Rotterdamseweg 402 M2629 HH Delft, The Netherlands, www.lenntech.com. Consulté le 03 juillet 2004.
- Lindman, U. 2005. "The nature and chemistry of toxicants". In: *Environmental toxicity testing*. K.C. Thompson, K. Wadhia and A. P. Loibner (eds). Oxford (UK): Blackwell publishing, and Boca Raton (USA): CRC Press. pp 68-69.
- Lock, K. et C. R. Janssen. 2001a. "Cadmium toxicity for terrestrial invertebrates: taking soil parameters affecting bioavailability into account". *Ecotoxicology*, vol. 10, p. 315-322.
- Lock, K. et C. R. Janssen. 2001b. "Effects of clay and organic matter type on the ecotoxicity of Zinc and Cadmium to the potworm *Enchytraeus albidus*". *Chemosphere*, vol. 44, p. 1669-1672.
- Lotufo, G. R., J. D. Farrar, L. S. Inouye, T. S. Bridges et D. B. Ringelberg. 2001. "Toxicity of sediment-associated nitroaromatic and cyclonitramine compounds to benthic invertebrates". *Environ.Toxicol.Chem.*, vol. 20, no. 8, p. 1762-1771.

- Lotufo, G.R. et M. J. Lydy. 2005. "Comparative Toxicokinetics of Explosive Compounds in Sheepshead Minnows". *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 49, No. 2, p. 206-214.
- Lukkari, T., M. Taavitsainen, M. Soimasuo, A. Oikari et J. Haimi. 2004. "Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* to copper and zinc exposure : differences between populations with and without earlier metal exposure". *Environmental Pollution*, vol. 129, p. 377-386.
- Ma, W. C., T. Edelman, I. Van Beersum et T. Jans. 1983. "Uptake of cadmium, zinc, lead and copper by earthworms near a Zn-smelting complex. Influence of soil pH and organic matter". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 30, no. 1, p. 424-427.
- Malecki, M. R., E. F. Neuhauser et R. C. Loehr. 1982. "The effects of metals on growth and reproduction of *E. foetida* (Oligochaeta, Lumbricidae)". *Pedobiologia*, vol. 24, p. 129-137.
- Marciniszyn, J., J. A. Hartsuck et J. Tang. 1976. "Mode of inhibition of acid proteases by pepstatin". *J. Biol. Chem.*, vol. 251, no. 22, p. 7088-7094.
- Marinussen, M. P. J. C., S. E. A. T. M. van der Zee et F. A. M. de Haan. 1997. "Effet of Cd or Pb addition to Cu-contaminated soil on tissue Cu accumulation in the earthworm *Dendrobaena veneta*". *Ecotoxicol. Environ. Safe.*, vol. 38, p. 309-315.
- Marois, A., A. Gagnon, S. Thiboutot, G. Ampleman, M. Bouchard. 2004. "Caractérisation des sols de surface et de la biomasse dans les secteurs d'entraînements, Base des Forces Canadiennes, Valcartier". Rapport DRDC-VALCARTIER-TR-2004-206. Defense R&D Canada, Valcartier, QC, CA.
- Martin, M. H. et P. J. Coughtrey. 1975. "Preliminary observations on the levels of cadmium in a contaminated environment". *Chemosphere*, vol. 3, p. 155-160.
- McKay, E. A., J. Overnell, B. Dunbar, I. Davidson, P. E. Hunziker, J. H. R. Kägi et J. E. Fothergill. 1993. "Complete amino acid sequences of five dimeric and four monomeric forms of metallothionein from edible mussel *Mytilus edulis*". *Eur. J. Biochem.*, vol. 218, p. 183-194.
- McLellan, W., W. Hartley et M. E. Brower. 1988. "Octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX)". In: *Drinking water health advisory : Munitions*. W. Roberts and W. Hartley (eds). Washington, DC, Office of Drinking Water Health Advisories, U.S. Environmental Protection Agency. p. 247-273.

- MDDEP. 2006. Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés. Gouvernement du Québec.
www.mddep.gouv.qc.ca/sol/terrains/politique; consulté en mars 2006.
- Miyairi, S., S. Shibata et A. Naganuma. 1998. "Determination of metallothionein by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using an isocratic solvent system". *Analytical Biochemistry*, vol. 258, p. 168-175.
- Morin, A. et J. Houseman. 2003. *Annélides, les animaux; Structures et fonctions*. Cours présenté en Biologie Animale. Département de Biologie. Université d'Ottawa.
- Morgan, A. J. et B. Morris. 1982. "The accumulation and intracellular compartmentation of cadmium, lead, zinc and calcium in two earthworm species (*Dendrobaena rubida* and *Lumbricus rubellus*) living in highly contaminated soil". *Histochemistry*, vol. 75, p. 269-285.
- Morgan, J. E. et A. J. Morgan. 1988. "Earthworms as biological monitors of cadmium, copper, lead and zinc in metalliferous soils". *Environ. Poll.*, vol. 54, p. 123-138.
- Morgan, J. E. et A. J. Morgan. 1989. "The effect of lead incorporation on the elemental composition of earthworm (Annelida, Oligochaeta) chloragosome granule". *Histochemistry*, vol. 92, p. 237-241.
- Morgan, J. E. et A. J. Morgan. 1990. "The distribution of cadmium, copper, lead, zinc and calcium in the tissue of the earthworm *Lumbricus rubellus* sampled from one uncontaminated soil and four polluted soils". *Oecologia*, vol. 84, p. 559-566.
- Morgan, A. J., J. E. Morgan, M. Turner, C. Winters et A. Yarwood. 1993. "Metals relationships of earthworms". In: *Ecotoxicology of metals in invertebrates*. Dallinger R., Rainbow P.S. (Eds.). Boca Raton (USA): Lewis Publishers. pp. 333-358.
- Morgan, A. J., S. R. Stürzenbaum, C. Winters et P. Kille. 1999. "Cellular and molecular aspects of metal sequestration and toxicity in earthworms". *Invertebrate reproduction and development*, vol. 36, no. 1-3, p. 17-24.
- Morgan, A. J., S. R. Stürzenbaum, C. Winters, G. W. Grime, A. A. Nor Azwady et P. Kille. 2004. "Differential metallothionein expression in earthworm (*Lumbricus terrestris*) tissues". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 57, p. 11-19.

- Morris, C. A., S. R. Stürzenbaum, B. Nicolaus, A. J. Morgan, J. L. Harwood et P. Kille. 1999a. "Identification and characterization of metallothioneins from indicator species". In: *Metallothionein IV*. Klaassen, C. (eds), Basel (Switzerland): Birkhauser Verlag. pp 621-627.
- Morris, C. A., B. Nicolaus, V. Sampson, J. L. Harwood et P. Kille. 1999b. "Identification and characterization of a recombinant metallothionein protein from a marine alga, *Fucus vesiculosus*". *Biochem.J.*, vol. 338, p. 553-560.
- Mounaji, K., N.-E. Erraiss et M. Wegnez. 2002. "Identification of metallothionein in *Pleurodeles waltl*". *Z. Naturforsch.* vol. 57C, p. 727-731.
- Ndayibagira, A., N. Ait Ali, Y. Berthelot, S. Thiboutot, G. Ampleman, G. I. Sunahara et P.-Y. Robidoux. 2003. "Métallothionéine chez les vers de terre: Biomarqueurs de la biodisponibilité des métaux lourds". Présentation au colloque du Chapitre Saint Laurent 2003, Montreal, Québec, Canada.
- Ndayibagira, A., G. I. Sunahara et P.-Y. Robidoux. 2004. "Rapid isocratic HPLC quantification of metallothioneins as a biomarker for cadmium exposure in earthworm *Eisenia andrei*". Applied Ecotoxicology Group presentation, NRC-BRI, Montréal, Québec, Canada.
- Ndayibagira, A., G. I. Sunahara et P.-Y. Robidoux. 2007. "Rapid isocratic HPLC quantification of metallothionein-like proteins as biomarkers for cadmium exposure in the earthworm *Eisenia andrei*". *Soil. Biol. Biochem.*, vol. 39, p. 194-201.
- Neuhauser, E. F., R. C. Loehr, D. L. Milligan et D. L. Malecki. 1985. "Toxicity of metals to the earthworm *Eisenia andrei*". *Biol. Fert. Soils.*, vol. 1, p. 149-152.
- Nguyen, Q. et A. Furst. 1998. "Acute toxicity of cadmium and zinc in the earthworm (*Lumbricus terrestris*)". *Biol. Trace. Element. Research.*, vol. 18, p. 81-83.
- Nielson, K. B., C. L. Atkin et D. R. Winge. 1985. "Distinct Metal-binding Configurations in Metallothionein". *J. Biol. Chem.*, vol. 260, p. 5342-5350.
- NRC. 1973. "Lead in the Canadian environment". NRC associate committee on scientific criteria for environmental quality, National research Council. p 22-23.
- OCDE. 1984. "Guideline for testing chemicals No.207. Earthworm, acute toxicity tests". Organisation pour la Coopération et le Développement Economique, Paris, France.

- Olsson, P. E. et C. Haux. 1986. "Increased hepatic metallothionein content correlates to cadmium accumulation in environmentally exposed Perch (*Percha fluviatilis*)". *Aquatic Toxicology*, vol. 9, p. 231-242.
- Onosaka, S. et M. G. Cherian. 1981. "The induced synthesis of metallothionein in various tissues of rat in response to metals. I. Effects of repeated injection of cadmium salt". *Toxicology*, vol. 22, p. 91-101.
- Palacek, E. et Z. Pechan. 1970. "Estimation of nanogram quantities of proteins by pulse-polarographie technique". *Analytical Biochemistry*, vol. 42, p. 59-71.
- Park, J. D., Y. Liu et C. D. Klassen. 2001. "Protective effect of metallothionein against toxicity of cadmium and other metals". *Toxicology*, vol. 163, p. 93-100.
- Patierno, S. R., N. R. Dellis, R. M. Evans et M. Costa. 1983. "Application of a modified ²⁰³Hg binding assay for metallothionein". *Life. Sci.*, vol. 32, p. 1629-1636.
- Peakall, D. B. 1994. "Biomarkers, the way forward in environmental assessment". *Toxicol. Ecotoxicol. News.*, vol. 1, p. 55-60.
- Pearson, K. 190). "On Lines and Planes of Closest Fit to Systems of Points in Space". *Philosophical Magazine*, vol. 2, no. 6, p. 559-572.
- Pedersen, S. R., K. L. Pedersen, P. Højrup, J. Knudsen et M. H. Depledge. 1998. "Induction and identification of cadmium-, zinc- and copper-metallothioneins in the shore crab *Carcinus maenas*". *Comparative Biochemistry and Physiology C*. vol. 120, p. 251-259.
- Peijnenburg, W. J. G. M., R. Baerselman, A. C. de Groot, T. Jager, L. Posthuma et R. P. M. Van Veen. 1999. "Relating environmental availability to bioavailability: Soil-type-dependent metal accumulation in the Oligochaete *Eisenia andrei*". *Ecotoxicology and Environmental Safety* vol. 44, p. 294-310.
- Pelletier, E., P. G. C. Campbell et F. Denizeau. 2004. *Ecotoxicologie moléculaire: principes fondamentaux et perspectives de développement*. Ste-Foy, (Québec) : Presses de l'Université du Québec.
- Pennington, J. C., K. A. Thorn, L. S. Inouye, V. A. McFarland, A. S. Jarvis, C. H. Lutz, C. A. Hayes et B. E. Porter. 1999. "Explosives conjugation products in remediation matrices: Final Report." Technical Report SERDP-99-4. U.S. Army Engineer Waterways Experiment Station, Vicksburg, MS, USA.

- Perceval, O., B. Pinel-Alloul, G. Méthot, Y. Couillard, A. Giguère, P. G. C. Campbell et L. Hare. 2002. "Cadmium accumulation and metallothionein synthesis in freshwater bivalves (*Pyganodon grandis*): relative influence of the metal exposure gradient versus limnological variability". *Environ. Poll.*, vol. 118, p. 5-17.
- Phillips, C. T., R. T. Checkai et R. S. Wentsel. 1993. "Toxicity of selected munitions and munition-contaminated soil on the earthworm (*Eisenia andrei*)". Rapport ERDEC-TR-037. U.S. Army Chemical and Biological Defense Agency, Aberdeen Proving Ground, Maryland, USA.
- Postma, J. F., S. Mol, H. Larsen et W. Admiraal. 1995. "Life cycle changes and zinc shortage in cadmium-tolerant midges, *Chironomus riparius* (Diptera), reared in the absence of cadmium". *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 14, no. 1, p. 117-122.
- Ramana Kumari, M. V., M. Hiramatsu et M. Ebadi. 1998. "Free Radical Scavenging Actions of Metallothionein Isoforms I and II". *Free Rad. Res.*, vol. 29, p. 93-101.
- Raspor, B., M. Pačić et M. Erč. 2001. "Analysis of metallothioneins by the modified Brdička procedure". *Talanta*, vol. 55, p. 109-115.
- Reinecke, S. A. et A. J. Reneicke. 1997. "The influence of lead and manganese on spermatozoa of *Eisenia fetida* (Oligochaeta)". *Soil and Biochemistry*, vol. 29, no. 3-4, p. 737-742.
- Regoli, F., M. Nigro et F. Orlando. 1998. "Lysosomal and antioxidant responses to metals in the antarctic scallop *Adamussium colbecki*". *Aquat. Toxicol.*, vol. 40, p. 375-392.
- Regoli, F., 2000. "Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: A predictive biomarker of oxidative stress". *Aquat. Toxicol.*, vol. 50, p. 351-361.
- Ribera, D. et M. Saint-Denis. 1999. "Le ver *Eisenia fetida* : Intérêts et perspectives en écotoxicologie terrestre". *Écotoxicologie*, vol. 124, no. 4, p. 411-420.
- Richards, M. P. 1991. "Purification and quantification of metallothionein by RP-HPLC". *Method. Enzymol.*, vol. 205, p. 217-238.
- Rida, A. M. A. 1994. "Les vers de terre et l'environnement". *La recherche*, vol. 25, p. 260-267.

- Robbins, A. H., D. E. McRee, M. Williamson, S. A. Collett, N. H. Xuong, W. F. Furey, B. C. Wang et C. D. Stout. 1991. "Refined crystal structure of Cd, Zn metallothionein at 2.0 Å resolution". *J. Mol. Biol.*, vol. 221, no. 4, p. 1269-1293.
- Robidoux, P.-Y., G. Bardai, M. Sarrazin, L. Paquet, P. Gong, J. Hawari et G. I. Sunahara 2000a. "Ecotoxicological risk assessment of an antitank firing range contaminated with explosives". NRCC Report #43317. National Research Council, Biotechnology Research Institute, Montreal, Québec. 64p.
- Robidoux, P.-Y., C. Svendsen, J. Caumartin, J. Hawari, G. Ampleman, S. Thiboutot, J. M. Weeks et G. I. Sunahara 2000b. "Chronic toxicity of energetic compounds in soil using the earthworm (*Eisenia andrei*) reproduction test". *Environmental toxicology and chemistry*, vol. 19, p. 1764-1773.
- Robidoux, P.-Y., J. Hawari, S. Thiboutot, G. Ampleman et G. I. Sunahara. 2001. "Chronic toxicity of octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX) in soil using the earthworm (*Eisenia andrei*) reproduction test". *Environmental Pollution*, vol. 111, p. 283-292.
- Robidoux P.-Y., J. Hawari, S. Thiboutot et G. I. Sunahara. 2002a. "Ecotoxicological risk assessment of explosives contaminated sites". In: *Environmental Analysis of Contaminated Sites: Toxicological Methods and Approaches*. Sunahara G. I., Renoux A. Y., Gaudet C. L., Thellen C., Pilon A. (Eds). Sussex (UK): John Wiley and Sons. pp 335-359.
- Robidoux, P.-Y., J. Hawari, G. Bardai, L. Paquet, G. Ampleman, S. Thiboutot et G. I. Sunahara. 2002b. "TNT, RDX and HMX decrease earthworm (*Eisenia andrei*) life-cycle responses in a spiked natural forest soil". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 43, p. 379-388.
- Robidoux, P.-Y., G. Bardai, L. Paquet, G. Ampleman, S. Thiboutot, J. Hawari et G. I. Sunahara. 2003. "Phytotoxicity of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) and octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX) in spiked artificial and natural forest soils". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 44, no. 2, p. 198-209.
- Robidoux, P.-Y., C. Dubois, J. Hawari et G. I. Sunahara. 2004a. "Assessment of soil toxicity from an antitank firing range using *Lumbricus terrestris* and *Eisenia andrei* in mesocosms and laboratory study". *Ecotoxicology*, vol. 13, no. 6, p. 603-614.
- Robidoux, P.-Y., P. Gong, M. Sarrazin, G. Bardai, L. Paquet, J. Hawari, C. Dubois et G. I. Sunahara. 2004b. "Toxicity assessment of contaminated soils from antitank firing range". *Ecotox. Environ. Safe.*, vol. 58, p. 300-313.

- Robidoux, P. Y., C. Svendsen, M. Sarrazin, S. Thiboutot, G. Ampleman, J. Hawari, J. M. Weeks et G. I. Sunahara. 2005. "Assessment of a 2,4,6-Trinitrotoluene-Contaminated Site Using *Aporrectodea rosea* and *Eisenia andrei* in Mesocosms". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 46, p. 1-11.
- Robidoux, P.-Y., B. Lachance, L. Didillon, F. O. Dion et G. I. Sunahara. 2006. "Développement de recommandations préliminaires de qualité du sol vis-à-vis des fonctions écologiques et de la santé humaine pour les matériaux énergétiques en vue de s'assurer de la durabilité de l'entraînement des Forces Canadiennes". Rapport NRC#45936. CNRC, IRB, Montréal, Québec.
- Robidoux, P.-Y., B. Lachance, S. Thiboutot, G. Ampleman et G. I. Sunahar. 2008. "Development of Ecological and Human Health Preliminary Energetic Materials Soil Concentrations for Military Training Sustainability of Canadian Forces". SETAC Word Congress, Sydney, Australia, Aout 2008.
- Rocheleau, S., M. Martel, G. Bardai, M. Sarrazin, S. Dodard, L. Paquet, A. Corriveau, R. G. Kuperman et R. T. Checkai. 2005. "Toxicity of nitro-heterocyclic and nitroaromatic energetic materials to terrestrial plants in a natural sandy loam soil". Rapport #A498734. Edgewood Chemical Biological Center, Aberdeen proving ground, MD, and CNRC-IRB, Montréal, Québec. 105p.
- Roelofs D., J. Marien et N. M. Van Straalen. 2007. "Differential gene expression profiles associated with heavy metal tolerance in the soil insect *Orchesella cincta*". *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 37, p. 287-295.
- Roesijadi, G. 1994a. "Metallothionein induction as a measure response to metal exposure in aquatic animals". *Environ. Health. Perspect.*, vol. 102, no. 12, p. 91-96.
- Roesijadi, G. 1994b. "Metallothionein and its role in toxic metal regulation". *Comp.Biochem.Physiol.C*, vol. 113, no. 2, p. 117-123.
- Roesijadi, G., K. M. Hansen et M. E. Unger. 1996. "Cadmium-induced metallothionein expression during embryonic and early larval development of the mollusc *Crassostrea virginica*." *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 140, p. 356-363.
- Rose, W. L., R. M. Nisbet, P. G. Green, S. Norris, T. Fan, E. H. Smith, G. N. Cherr et S. L. Anderson. 2006. « Using an integrating approach to link biomarker responses and physiological stress to growth impairment of cadmium-exposed larval topmelt. » *Aquatic.Toxicol.* **80** : 298-308.

- Rosen, G. et G. R. Lotufo. 2007. "Bioaccumulation of explosive compounds in the marine mussel, *Mytilus galloprovincialis*". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol.68, no. 2, p.237-245.
- Ruppert, E. E. et R. D. Barnes. 1994. *Invertebrate Zoology*. Fort Worth (USA): Saunders College Publishing. 1056p.
- Savard, K. 2005. "Évaluation des effets d'une exposition simultanée à des composés polynitro-organiques et certains métaux chez le ver de terre". Mémoire présentée comme exigence partielle à la maîtrise en sciences de l'environnement – Université du Québec à Montreal. 129 p.
- Savard, K., Y. Berthelot, A. Auroy, P. A. Spear, B. Trottier et P.-Y. Robidoux. 2007. "Effects of HMX-lead mixtures on reproduction of earthworm *Eisenia andrei*". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 53, no. 3, p. 351-358.
- Schafer, R. et R.K. Achazi. 1999. "The toxicity of soil samples containing TNT and other ammunition derived compounds in the enchytraeid and collembola-biotest". *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 6, p. 213–219.
- Scott-Fordsman, J. J. et J. M. Weeks. 2000. "Biomarkers in earthworms". *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 165, p. 117-159.
- Shaw, P. J. A. 2003. *Multivariate statistics for the Environmental Sciences*. London (UK): Hodder-Arnold. 233p.
- Siekierska, E. et D. Urbanska-Jasik. 2002. "Cadmium Effect on the ovarian structure in earthworm *Dendrobaena veneta* (Rosa)". *Environmental Pollution*, vol. 120, p. 289-297.
- Simini, M., R. T. Checkai, R. G. Kuperman, C. T. Phillips, J. E. Kolakowski, C. W. Kurnas et G. I. Sunahara. 2004a. "Reproduction and survival of *Eisenia andrei* in a sandy loam soil amended with nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX". *Pedobiologia*, vol. 47, p. 657-662.
- Simini, M., R. T. Checkai, R. G. Kuperman, C. T. Phillips, J. E. Kolakowski, C. W. Kurnas et G. I. Sunahara. 2004b. "Toxicity of RDX, HMX, 2,4-DNT and 2,6-DNT to the earthworm *E.andrei* in a sandy loam soil". Rapport ECBC-TR-467. U.S. Army, Edgewood Chemical and Biological Center, Aberdeen Proving ground, MD, USA.
- Spangord, R.J. 1980. "Environmental fate studies on certain munition wastewater constituents". Rapport SRI LSU-7934. SRI International, Menlo Park, CA, USA.

- Spurgeon, D. J., S. P. Hopkin et D. T. Jones. 1994. "Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): Assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems". *Environmental Pollution*, vol. 84, p. 123-130.
- Spurgeon, D. J. et S. P. Hopkin. 1995. "Extrapolation of the laboratory-based OECD earthworm toxicity test to metal-contaminated field sites". *Ecotoxicology*, vol. 4, p. 190-205.
- Spurgeon, D. J. et S. P. Hopkin. 1996. "Effects of metal contaminated soils to the growth, sexual development, and early cocoon production of the earthworm *Eisenia fetida*, with particular reference to Zinc". *Ecotox. Environ. Safe.*, vol. 35, p. 86-95.
- Spurgeon, D. J., C. Svendsen, P. Kille, A. J. Morgan et J. M. Weeks. 2004a. "Responses of earthworms (*L. rubellus*) to copper and cadmium as determined by juvenile traits in a specifically designed test system". *Ecotox. Environ. Safe.*, vol. 57, p. 56-64.
- Spurgeon, D. J., S. R. Stürzenbaum, C. Svendsen, P. K. Hankard, A. J. Morgan, J. M. Weeks and P. Kille. 2004b. "Toxicological, cellular and gene expression responses in earthworms exposed to copper and cadmium". *Comp. Biochem. Biophysiol. C.*, vol. 38, p. 11-21.
- Steevens, J. A., B. M. Duke, G. R. Lotufo et T. S. Bridges. 2001. "Toxicity of the explosives 2,4,6-trinitrotoluene, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine, and Octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine in sediments to *Chironomus tentans* and *Hyalella azteca*: low-dose hormesis and high-dose mortality". *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 21, no. 7, p. 1475-1482.
- Stewart, E. M., R. W. Furness et L. R. Monteiro. 1996. "Relationships between heavy metal and metallothionein concentrations in lesser black-backed gulls, *Larus fuscus*, and Cory's shearwater, *Calonectris diomedea*". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 30, p. 299-305.
- Stürzenbaum, S. R., P. Kille et A. J. Morgan. 1998. "The identification, cloning and characterization of earthworm metallothionein". *FEBS Letter*, vol. 431, p. 437-442.
- Stürzenbaum, S. R., C. Winters, M. Galay, A. J. Morgan et P. Kille. 2001. "Metal ion trafficking in earthworms: identification of a cadmium-specific metallothionein". *Journal of Biological Chemistry*, vol. 36, p. 34013-34018.

- Sunaga, H., E. Kobayashi, N. Shimojo et K. T. Suzuki. 1987. "Detection of sulfur-containing compounds in control and cadmium-exposed rats organs by HPLC vacuum ultraviolet inductively coupled plasma - atomic emission spectrometry (HPLC-ICP)". *Anal. Biochem.*, vol. 160, p.160-168.
- Sunahara, G. I., G. Lotufo, R. Kuperman et J. Hawari. 2009. *Ecotoxicology of Explosives*. Boca Raton (USA): CRC Press
- Sun Cho, Y., B. Nim Choi, E.-M. Ha, K. Hong Kim, S. Koo Kim, D. Soo Kim et Y. Kwon Nam. 2005. "Shark (*Scyliorhinus torazame*) metallothionein: cDNA cloning, genomic sequence, and expression analysis". *Marine Biotechnology*, vol. 7, no. 4, p. 350-362.
- Suzuki, K. T., M. Yamamura et T. Mori. 1980. "Cadmium-binding proteins induced in the earthworm". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 9, p. 415-424.
- Suzuki, K. T., H. Akitomi et R. Kawamura. 1984. "Cadmium, copper and zinc-binding protein (metallothionein) in the liver of the water lizard *Triturus pyrrhogaster*". *Toxicol. Lett.*, vol. 21, no. 2, p. 179-184.
- Suzuki, K. T. 1991. "Detection of metallothionein by high performance liquid chromatography inductively coupled plasma emission spectrometry". *Methods Enzymol.*, vol. 205, p. 198-205.
- Suzuki, K. T., N. Imura et M. Kimura. 1993. *Metallothionein III: Biological Roles and Medical Implications*. Basel (Switzerland): Birkhauser Verlag. 479p.
- Svendsen, C., G. Paton et J. M. Weeks. 2002. "Soil biomarkers (invertebrates and microbes) for assessing toxicity". In: *Environmental analysis of contaminated sites*. G. I. Sunahara, A. Y. Renoux, C. I. Thellen, C. I. Gaudet and A. Pilon (eds). Toronto (On): Wiley canada. 490p.
- Talmage, S. S., D. M. Opresko, C. J. Maxwell, C. J. Welsh, F. M. Cretella, P. H. Reno et F. B. Daniel. 1999. "Nitroaromatic munition compounds: Environmental effects and screening values". *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 161, p. 1-156.
- Thiboutot, S., G. Ampleman, A. Gagnon, A. Marois, T. F. Jenkins, M. E. Walsh, P. G. Thorne et T. A. Ranney. 1998. "Characterization of Antitank Firing Ranges at CFB Valcartier, WATC Wainwright and CFAD Dundurn". Rapport DREV-R-9809. Defense R&D Canada, Valcartier, Québec, Canada. 67p.

- Thiboutot, S., G. Ampleman, A. Marois, A. Gagnon, M. Bouchard, A. Hewitt, T. Jenkins, M. Walsh, K. Bjella, C. Ramsey, T. A. Ranney. 2004. "Environmental conditions of surface soils, CFB Gagetown Training area : Delineation of the presence of munitions related residues (Phase III, final report)". Rapport DRDC-VALCARTIER-TR-2004-205. Defense R&D Canada, Valcartier, QC, CA and Cold Region Research and Engineering Lab, Hanover, NH, USA.
- Timmermans, M. J. T. N., J. Ellers, D. Roelofs et N. M. Van Straalen. 2005. "Metallothionein mRNA expression and cadmium tolerance in metal-stressed and reference populations of the springtail *Orchesella cincta*". *Ecotoxicology*, vol. 14, p. 727–739.
- Trinchella, F., M. Riggio, M. G. Filosa, E. Parisi et R. Scudiero. 2006. "Cadmium distribution and metallothionein expression lizard tissues following acute and chronic cadmium intoxication". *Comp. Biochem. Physiol. C.*, vol. 144, p. 272-278.
- Umezawa, H., T. Aoyagi, H. Morishima, M. Matsuzaki et M. Hamada. 1970. "Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by *Actinomycetes*". *J. Antibiot.*, vol. 23, no. 5, p. 259–62.
- USEPA - U.S. Environment Protection Agency. 1989. "Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites". Report US-EPA 600/3-88/029. US-EPA Environmental Research Laboratory, Corvallis, OR, USA. 98p.
- USEPA - U.S. Environment Protection Agency. 1997. "Method 8330, Nitroaromatics and Nitramines by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Test methods for evaluating solid wastes". Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington D.C., USA.
- USEPA - U.S. Environment Protection Agency. 2003. Ecological soil screening levels for lead. Interim Final. OSWER Directive 9285.7-70. Office of solid waste and emergency response, Washington D.C., USA. p. 1-244.
- USEPA - U.S. Environment Protection Agency. 2005. Ecological soil screening levels for cadmium. Interim final. OSWER directive 9285.7-65. Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington D.C., USA.
- Ureña, R., S. Peri, J. del Ramo et A. Torreblanca. 2007. "Metal and metallothionein content in tissues from wild and farmed *Anguilla anguilla* at commercial size". *Environ. Inter.*, vol. 33, no. 4, p. 532-539.

- Van Beeks, H. et A. J. Barrs. 1988. "Isolation and quantitation of cadmium-, zinc- and copper-metallothioneins by high performance liquid chromatography-atomic absorption spectrometry". *Journal of Chromatography*, vol. 442, p. 345-352.
- Van Cleef-Toedt, K. A., L. A. E. Kaplan, J. F. Crivello. 2000. "Metallothionein mRNA expression in spawning and non-spawning *Fundulus heteroclitus* following acute exposure to starvation and waterborne cadmium". *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 22, p. 319-327.
- Van Gestel, C. A. M. et W. A. Van Dis. 1988. "The influence of soil characteristics on the toxicity of four chemicals to the earthworm *Eisenia fetida andrei* (Oligochaeta)". *Biol. Fert. Soils.*, vol. 6, p. 262-265.
- Van Gestel, C. A. M., W. A. Van Dis, E. M. Dirven-Van Bremen, P. M. Sparenburg et R. Baerselman. 1991. "Influence of cadmium, copper and pentachlorophenol on growth and sexual development of *Eisenia andrei* (Oligochaeta; Annelida)". *Biol. Fert. Soils.*, vol. 12, p. 117-121.
- Van Gestel, C. A. M., E. M. Dirven-Van Breemen, R. Baerselman, H. J. B. Emans, J. A. M. Janssen, R. Postuma et P. J. M. Van Vliet. 1992. "Comparison of sublethal and lethal criteria for nine different chemicals in standardized toxicity tests using the earthworm *Eisenia andrei*". *Ecotox. Environ. Safe.*, vol. 23, p. 206-220.
- Venter, J. M. et A. J. Reinecke. 1988. "Life-cycle of the compost worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta)". *South Africa Journal of Zoology*, vol. 23, no. 3, p. 161-165.
- Viarengo, A., E. Ponzano, F. Dondero et R. Fabbri. 1997. "A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms : an application to mediterranean and antarctic molluscs". *Mar. Environ. Res.*, vol. 44, no. 1, p. 69-84.
- Viarengo, A., B. Burlando, M. Cavaletto, B. Marchi, E. Ponzano et J. Blasco. 1999. "Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*". *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 277, no. 6, p. 1612-1619.
- Vijver, M. G., J. P. M. Vink, C. J. H. Miermans et C. A. M. Van Gestel. 2003. "Oral sealing using glue: a new method to distinguish between intestinal route and dermal uptake of metals in earthworms". *Soil. Biol. Biochem.*, vol. 35, p. 125-132.

- Vom Saal, F. S., S. C. Nagel, B. G. Timms et W. V. Welshons. 2005. "Implications for human health of the extensive bisphenol A literature showing adverse effects at low doses: A response to attempts to mislead the public". *Toxicology*, vol. 212, no. 2-3, p. 244-252.
- Yamamura, M., T. Mori et K. T. Suzuki. 1981. "Metallothionein induced in the earthworm". *Experientia*, vol. 37, p. 1187-1189.
- Yamamura, M., et K.T. Suzuki (1986). "Isolation and characterization of metallothionein from the tortoise *Clemmys mutica*." *Comp. Biochem. Physiol C* **79(1)**, 63-69.
- Yinon, J. 1990. *Toxicity and metabolism of explosives*. Boston (USA): CRC Press. 171 p.
- Yu, X., Z. Wu et C. Fenselau. 1995. "Covalent sequestration of melphalan by metallothionein and selective alkylation of cysteines 7". *Biochemistry*, vol. 34, p. 3377-3385.
- Waalkes, M. P., M. J. Harvey et C. D. Klaassen. 1984. "Relative *in vitro* affinity of hepatic metallothionein for metals". *Toxicology Letters*, vol. 20, no. 1, p. 33-39.
- Waalkes, M. P. et C. D. Klaassen. 1985. "Concentration of metallothionein in major organs of rats after administration of various metals". *Fundamental and applied toxicology*, vol. 5, p. 473-477.
- Wallwork, J. A. 1983. *Earthworm Biology*. London (UK): Edward Arnold.
- Wan, M., J. H. R. Kägi et P. E. Hunziker. 1993. "Resolution and quantification of four metallothionein isoforms from rabbit kidney cells". *Protein expression and purification*, vol. 4, p. 38-44.
- Weast, R. 1985. *Handbook of chemistry and physics*. Boca Raton (USA): CRC Press.
- Wei, D., D. Fabris et C. Fenselau. 1999. "Covalent sequestration of phosphoramidate mustard by metallothionein – An *in vitro* study". *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 27, no. 7, p. 786-791.
- Wu, S.M., K. J. Jong et Y. J. Lee. 2006. "Relationships among metallothionein, cadmium accumulation, and cadmium tolerance in three species of fish." *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 76, p. 595-600.